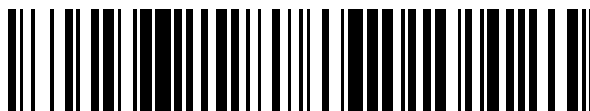


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 339**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2014** **E 14179941 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 2835648**

54 Título: **Inmunoensayo para fenetilaminas de las subfamilias 2C y DO**

30 Prioridad:

05.08.2013 GB 201313938

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

09.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 339 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo para fenetilaminas de las subfamilias 2C y DO

Antecedentes de la invención

La invención se refiere al campo de la detección analítica de fármacos psicoactivos de la familia de la fenetilamina. Específicamente, se describe la inmunodetección de fenetilaminas 2C y DO, subfamilias de las fenetilaminas. Las fenetilaminas psicoactivas representan una gran familia de fármacos, incorporando cada miembro la subestructura de fenetilamina (Figura 1) y están ejemplificadas por los fármacos terapéuticos legales, pero de los que se abusa, anfetamina y metanfetamina, los compuestos derivados de plantas catinona y mescalina (3,4,5-trimetoxifenetilamina) y los fármacos de diseño MDMA y mefedrona. El gran número de fenetilaminas se puede clasificar aproximadamente en subfamilias según la naturaleza de los sustituyentes químicos en la subestructura básica de fenetilamina;

- las metilendioxi-fenetilaminas representadas por MDMA,
- las β -ceto-fenetilaminas representadas por catinona/mefedrona/metcatinona, que incluyen las pirrolidinofenonas, típicamente clasificadas como un subgrupo de las catinonas sintéticas, tales como la RS-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentan-1-ona (comúnmente denominada 3,4-metilendioxi-pirrovalerona o MDPV (véase la publicación de patente EP 2626358), y
- las 2,5-dimetoxi-fenetilaminas representadas, por ejemplo, por 1-(2,5-dimetoxi-4-yodofenil)etan-2-amina (2C-I) y 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB) (Figura 1).

La detección de las fenetilaminas psicoactivas es un componente necesario en los campos toxicológicos clínico y forense y está encontrando un uso cada vez mayor en los análisis en el lugar de trabajo para apoyar la salud y la seguridad. La principal técnica analítica usada para identificar fenetilaminas psicoactivas individuales es la espectrometría de masas (MS). Esta técnica de confirmación cara y especializada generalmente está precedida por el inmunoensayo, una técnica más barata y simple que usa anticuerpos con capacidades de detección tanto genéricas como específicas de las moléculas.

Actualmente hay métodos basados en inmunoensayo para varias subfamilias de la clase de la fenetilamina de fármacos psicoactivos, que incluyen mefedrona/catinona (Patente Europea No. 2442110), las pirrolidinofenonas, típicamente clasificadas como un subgrupo de las catinonas sintéticas (véase la publicación de la patente europea. 2626358), las anfetaminas y MDMA (Patente Europea No. 1321772). Dependiendo de la aplicación, pueden ser deseables anticuerpos genéricos o específicos de la molécula. Para una evaluación previa exhaustiva en la que hay decenas de moléculas en una familia, los anticuerpos genéricos podrían ser preferidos usando MS subsecuentemente para identificar una molécula individual. Alternativamente, cuando el requisito pudiera ser identificar una subfamilia de moléculas; un inmunoensayo específico para la subfamilia podría excluir, o mejor apoyar, un análisis subsecuente mediante MS.

Swortwood et al. 2013, en la Tabla 7, examinan la reactividad cruzada para un kit Randox MDPV (todos los miembros analizados de las subfamilias DO y 2C muestran menos de 0.1% de reactividad cruzada). Específicamente, de la subfamilia DO, cada una de las (\pm)-DOET, (\pm)-DOM y (\pm)-DOB analizadas muestran menos de 0.1% de reactividad cruzada en comparación con el 100% para (\pm)-MDPV y, de la subfamilia 2C, cada una de las 2C-E, 2C-B y 2C-T-7 analizadas muestra menos de 0.1% de reactividad cruzada cuando se compara con el 100% para (\pm)-MDPV. Swortwood et al. 2013, en la Tabla 7, también examinan la reactividad cruzada para un kit de Randox de mefedrona/metinona (todos los miembros analizados de las subfamilias DO y 2C muestran menos de 0.0125% de reactividad cruzada).

Específicamente, de la subfamilia de DO, cada una de las (\pm)-DOET, (\pm)-DOM y (\pm)-DOB analizadas muestran menos de 0.0125% de reactividad cruzada en comparación con el 100% para (\pm)-fedrona y, de la subfamilia 2C, cada una de las 2C-E, 2C-B y 2C-T-7 analizadas muestra menos de 0.0125% de reactividad cruzada en comparación con el 100% para (\pm)-mefedrona. Swortwood et al. 2013 concluyen que no hay inmunoensayos de fenetilamina actuales dedicados a la detección, por separado, de miembros de las subfamilias 2C y DO.

Petrie et al. 2013, en la Tabla 1, revisan la reactividad cruzada de "sales de baño" usando inmunoensayos de detección de anfetamina comercialmente disponibles - Ensayo II de anfetamina/metanfetamina AxSYM (Abbott); inmunoensayo de anfetamina/éxtasis de CEDIA (Thermo Fisher); y el ensayo de anfetaminas EMIT II Plus (Siemens). El ensayo AxSYM no muestra reactividad cruzada con ningún miembro analizado de la subfamilia DO (DOB, DOEt y DOM) o la subfamilia 2C (2C-I, 2C-B, 2C-T-2, 2C-T-4, 2C-T-7 y 2C-H), incluso cuando se analizan a 5000 ng/mL. Se ha mostrado que los ensayos de anfetamina EMIT y CEDIA se unen débilmente a los miembros de la subfamilia tanto 2C como DO cuando se analizan a concentraciones de 5000 ng/ml (Petrie et al. 2013). El ensayo CEDIA muestra reactividades cruzadas de ninguna (2C-I), 3.0% (2C-B), 2.2% (2C-T-2), 2.2% (2C-T-4), 2.8% (2C-T-7) y 3.1% (2C-H) para la subfamilia 2C y muestra reactividades cruzadas ligeramente más altas de 8.5% (DOB), 4.8% (DOEt) y 3.9% (DOM) para la subfamilia DO. El ensayo EMIT muestra reactividades cruzadas de 28.6% (2C-I), 36.0% (2C-B), 11.7% (2C-T-2), nada (2C-T-4), 18.1 (2C-T-7) y nada (2C-H) para la subfamilia 2C y muestra

reactividades cruzadas muy ligeramente más altas de 39.1% (DOB), 18.8% (DOEt) y 23.2% (DOM) para la subfamilia DO, aunque a concentraciones muy altas y poco realistas. Cada uno de los ensayos AxSYM, CEDIA y EMIT II Plus se analizaron a 5000, 20000 y 100000 ng/ml. Petrie et al. 2013 admiten que un nivel urinario de 100000 ng/ml probablemente solo se encontraría en casos de sobredosis severa. Ninguno de los ensayos AxSYM, CEDIA y EMIT II Plus se puede usar para discriminar entre fármacos de las subfamilias DO y 2C. Esta falta de sensibilidad y especificidad para una sola subfamilia (ya sea 2C o DO) impide que los ensayos CEDIA y EMIT se apliquen en la práctica para detectar y discriminar entre los fármacos 2C y DO. La incapacidad de unirse incluso a miembros analizados de las subfamilias DO y 2C excluye el uso del ensayo AxSYM como un cribado para miembros de las subfamilias DO y 2C.

Riceberg et al. 1974 describen inmunoensayos para el análisis de DOM (2,5-dimetoxi-4-metilfenilisopropilamina) y mescalina (3,4,5-trimetoxifenetilamina).

Un problema adicional que afronta la inmunodetección de fenetilaminas es la posibilidad de que los anticuerpos muestren una reactividad cruzada inesperada e indeseable con los suplementos nutricionales comunes y medicamentos comúnmente recetados dando lugar a falsos resultados positivos en los ensayos. Por ejemplo, se ha demostrado que la dimetilamilamina anorexígena reacciona de forma cruzada con los inmunoensayos de anfetamina (Vorce et al. 2011).

De este modo, existe la necesidad de la inmunodetección sensible y selectiva de fármacos 2C y DO, mientras se evita la reactividad cruzada no deseada.

Referencias

Petrie M, Lynch KL, Ekins S, Chang JS, Goetz RJ, WU AHB and Krasowski MD (2013). *Clinical Toxicology*, 51: 83-91.

Swortwood MJ, Hearn WL and DeCaprio AP. (2013). *Drug testing and Analysis*. Mayo, DOI: 10.1002 / dta.1489.

Vorce SP, Holler JM, Cawrse BM and Magluiglio Jr J (2011). *Journal of Analytical Toxicology*, 35: 183-187.

Riceberg LJ, Van Vunakis H, Levine L (1974). *Analytical Biochemistry*, 60: 551-559.

Dibujos

Figura 1. Ejemplos de compuestos en varias subfamilias de fenetilamina

Figura 2. Ejemplos de miembros de las subfamilias 2C y DO (con abreviaturas)

Figura 3. Haptenos e inmunógenos ejemplares.

Figura 4. Síntesis de Hapteno-1

Figura 5. Síntesis de Hapteno-2

Figura 6. Síntesis de Hapteno-3

Figura 7. Síntesis de Hapteno-4

Sumario de la invención

En este documento se describen los primeros inmunoensayos conocidos para la detección y determinación selectiva de fenetilaminas de las subfamilias 2C y DO. Los inmunoensayos están respaldados por nuevos sensibles anticuerpos específicos de la subfamilia. La invención describe además sustratos que comprenden un anticuerpo específico para compuestos de la subfamilia 2C y/o un anticuerpo específico para compuestos de la subfamilia DO. También se describen nuevos inmunógenos y kits que incorporan anticuerpos de la invención.

Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la invención es un método de inmunoensayo competitivo para detectar o determinar (determinar es sinónimo de cuantificar) fenetilaminas de la subfamilia 2C o la subfamilia DO, en el que un agente de detección compite con las fenetilaminas por unirse a un anticuerpo específico para fenetilaminas de la subfamilia 2C o DO. El método comprende poner en contacto una muestra in vitro tomada de un individuo o una disolución con un anticuerpo específico para fenetilaminas de la subfamilia 2C pero que no reacciona de forma cruzada con fenetilaminas de la subfamilia DO o un anticuerpo específico para fenetilaminas de la subfamilia DO, pero que no reacciona de forma cruzada con fenetilaminas de la subfamilia 2C; y uno o más agentes de detección que comprenden una subestructura de fenetilamina conjugada con una enzima o molécula fluorescente; medir la señal producida por el agente de detección; y deducir de una curva de calibración la presencia de, o la cantidad de, fenetilaminas de la subfamilia 2C o la subfamilia DO.

La muestra in vitro es cualquier muestra biológica apropiada tal como, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina o saliva. La muestra in vitro es preferentemente una muestra de suero, plasma u orina.

5 La disolución puede ser un líquido que se sospecha que contiene uno o más de estos fármacos. Alternativamente, como los fármacos de las familias 2C y DO están a menudo en forma de comprimido, el análisis de fármacos que se sospecha que contienen estos ingredientes psicoactivos puede requerir un pretratamiento para conseguir una formulación apropiada para inmunoanálisis, tal como la disolución en un líquido apropiado.

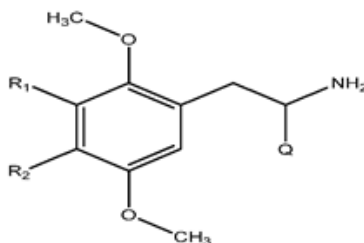
10 El método de inmunoensayo se basa en el bien conocido formato de ensayo competitivo en el que un analito objetivo que se une al anticuerpo, es decir, la molécula a detectar o determinar, compete con un agente de detección que también se une al anticuerpo, por los sitios de unión en el anticuerpo; cuanto más analito esté presente, menos agente de detección que se une al anticuerpo y menor será la señal medida.

15 El agente de detección puede ser cualquier sustancia detectable tal como una enzima, una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o un marcador radioactivo; es usual en un inmunoensayo que el agente de detección sea una estructura similar al analito objetivo en el que se ha conjugado una enzima o sustancia que tiene propiedades fluorescentes, o en la que se ha incorporado un radiomarcador. La conjugación es por medio de métodos estándar conocidos por la persona experta. Preferentemente, para el método de inmunoensayo de la invención, el agente de detección se basa en un compuesto con una subestructura de fenetilamina conjugada con una enzima o molécula fluorescente. Los ejemplos de agentes de detección y sus síntesis se describen en la sección de Métodos Generales, Ejemplos y Resultados.

20 Los criterios de "detección y determinación" para el método de inmunoensayo incluyen, como es bien sabido en la técnica, exceder de un valor de corte/concentración predefinido o medir el valor equivalente de calibración derivado de una curva de calibración (también conocida como una curva estándar).

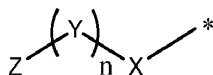
25 El anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C, pero que no reacciona de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia DO se produce contra un inmunógeno derivado por medio de la posición 4 de 2,5-dimetoxifenetilamina y el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO pero que no reacciona de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia 2C se produce contra un inmunógeno derivado por medio de la posición 4 de la 2,5-dimetoxi-N-metilfenetilamina.

30 El anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C pero que no reacciona de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia de la DO se produce contra un inmunógeno de estructura I en la que Q es H y el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO pero que no reacciona de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia 2C se deriva de un inmunógeno de estructura I en la que Q es CH₃



Estructura I

Para la estructura I (si Q es H o CH₃), R₁ es H y R₂ es



35 en la que X es -(alk)_{n1}-(A)_{n2}- en la que A, que está unido al resto de fenetilamina, es O, S o -N(H)-, alk es un resto alqueno de C₁₋₆, de cadena lineal sustituido o no sustituido o arileno y n₁ y n₂ son independientemente 0 o 1; Y es un grupo de reticulación, n = 0 o 1; y Z es un material portador que confiere antigenicidad (accm). Opcionalmente, alk es un resto alqueno de C₁₋₆ de cadena lineal sustituido, en el que el resto alqueno está sustituido terminalmente en cada extremo. Además, opcionalmente, la, o cada sustitución terminal se selecciona de un heteroátomo bivalente tal como S o un resto carbonilo (C=O).

40 Cuando n₁ y n₂ son ambos 0, X está ausente.

En una realización preferida, el anticuerpo usado en el método de la invención para detectar fenetilaminas de la subfamilia DO se deriva de un inmunógeno de Estructura I en la que R₁ es H, Q es CH₃, n₁ y n₂ = 1, A es -N(H)-, alk es -S-CH₂-CH₂-CO-, Y es 4-(succinimido-N-metil)ciclohexilcarbonilo, Z es BSA. Para detectar fenetilaminas de la subfamilia 2C, el anticuerpo se deriva preferentemente de un inmunógeno de Estructura I en la que R₁ es H, Q es H,

n_1 y $n_2 = 1$, A es -N(H)-, alk es -S-CH₂-CH₂-CO-, Y es 4-(succinimido-N-metil)ciclohexilcarbonilo y Z es BSA (inmunógeno de la Figura 3).

5 Opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, más opcionalmente, menos del 1% para dimetilamilamina, cuando se compara con el 100% para DOB. Se apreciará que se ha mostrado que la dimetilamilamina anorexígena reacciona de forma cruzada con los inmunoensayos de anfetamina (Vorce et al. 2011) y que es deseable evitar un falso positivo por la presencia de dimetilamilamina.

10 Alternativa o adicionalmente, opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, más opcionalmente, menos del 1% para una o ambas de anfetamina y metanfetamina, cuando se compara con el 100% para DOB. Se apreciará que la evitación de un falso positivo por la presencia de anfetamina y/o metanfetamina es deseable cuando se desea detectar fármacos de la subfamilia DO.

15 Alternativa o adicionalmente, opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, además opcionalmente, menos del 1% para 2C-B, cuando se compara con el 100% para DOB. Se apreciará que DOB y 2C-B difieren solo en la presencia o ausencia de una cadena lateral de metilo adyacente al grupo amino. También se apreciará que la ausencia de reactividad cruzada entre DOB y 2C-B facilita la detección de, y la discriminación entre, fármacos de las subfamilias DO y 2C.

20 Alternativa o adicionalmente, opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO es considerablemente más sensible a la subfamilia DO que los ensayos analizados en Petrie et al. (2013). Opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO muestra una sensibilidad (IC₅₀) de menos de 100 ng/ml, más opcionalmente, menos de 25 ng/ml, aún más opcionalmente, menos de 10, o menos de 5, o menos de 2.5, ng/ml para DOB.

El anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO puede exhibir una cualquiera, dos cualquiera, tres cualquiera o las cuatro, de las cuatro propiedades antes mencionadas.

25 Opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, más opcionalmente, menos del 1% para dimetilamina, cuando se compara con el 100% para 2C-B. Se apreciará que se ha demostrado que la dimetilamilamina anorexígena reacciona de forma cruzada con los inmunoensayos de anfetamina (Vorce et al. 2011) y que es deseable evitar un falso positivo por la presencia de dimetilamilamina.

30 Alternativa o adicionalmente, opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, más opcionalmente, menos del 1% para una o ambas anfetamina y metanfetamina, cuando se compara con el 100% para 2C-B. Se apreciará que la evitación de un falso positivo, por la presencia de anfetamina y/o metanfetamina, es deseable cuando se desea detectar fármacos de la subfamilia 2C.

35 Alternativa o adicionalmente, opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, más opcionalmente, menos del 1% para DOB, cuando se compara con el 100% para 2C-B. Se apreciará que DOB y 2C-B difieren solo en la presencia o ausencia de una cadena lateral de metilo adyacente al grupo amino. También se apreciará que la ausencia de reactividad cruzada entre DOB y 2C-B facilita la detección de, y la discriminación entre, fármacos de las subfamilias DO y 2C.

40 Alternativa o adicionalmente, opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C es considerablemente más sensible a la subfamilia 2C que los ensayos analizados en Petrie et al. (2013).

Opcionalmente, el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C muestra una sensibilidad (IC₅₀) de menos de 100 ng/ml, más opcionalmente, menos de 25 ng/ml, para DOB.

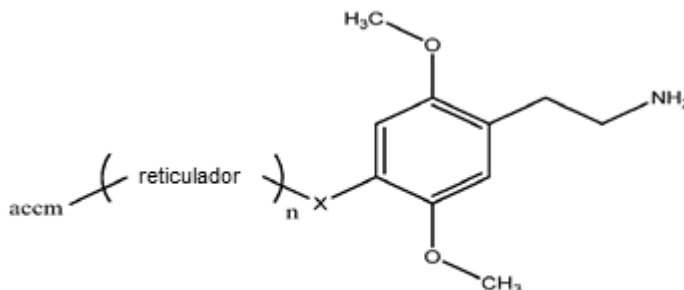
45 El anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C puede exhibir una cualquiera, dos cualquiera, tres cualquiera o las cuatro, de las cuatro propiedades mencionadas anteriormente.

Antes de la conjugación con el material portador que confiere antigenicidad, un hapteno preferido es el Hapteno-1 (Figura 3).

50 Materiales portadores que confieren antigenicidad y grupos de reticulación en relación con moléculas pequeñas y Estructura I. Los materiales portadores que confieren antigenicidad son bien conocidos en la técnica y puede ser cualquier material que comprende todo o parte del hapteno (la molécula pre-inmunogénica o "molécula pequeña") inmunogénico, tal como una proteína, un fragmento de proteína, un polipéptido sintético o un polipéptido semisintético.

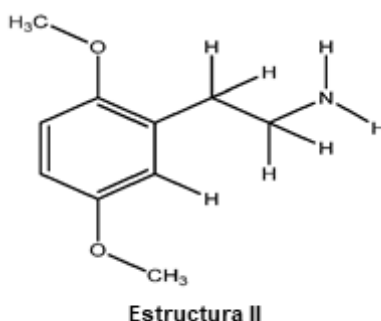
El procedimiento de formación de inmunógenos generalmente implica la copulación de un hapteno con un agente de reticulación, este último subsecuentemente se copula con un accm. También es posible copular un hapteno

directamente al accm. El concepto de conjugación accm-(reticulante)-hapteno para formar un inmunógeno está bien establecido; La conjugación y el punto exacto de unión de un hapteno a un reticulador se debe adaptar al hapteno particular y está guiado por los principios de la química orgánica sintética y de la inmunología. La siguiente estructura resalta los componentes de un inmunógeno (en el que $n = 0$ o 1) basado en un hapteno de 2,5-dimetoxifenetilamina sustituida en la posición 4; el hapteno podría estar igualmente sustituido en la posición 3, o un hapteno 2,5-dimetoxi-N-metilfenetilamina sustituido en la posición 3 o 4.



El grupo X se escoge de un heteroátomo tal como N, O o S; una cadena alquílica saturada, sustituida o no sustituida de cadena corta de 1-6 átomos de carbono funcionalizada en el extremo de la cadena; un grupo arileno funcionalizado opcionalmente; un heteroátomo copulado a una cadena lineal de alquilo saturada de 1-6 átomos de carbono funcionalizada en el extremo de la cadena o a un grupo arileno funcionalizado opcionalmente. La funcionalización del extremo de la cadena o arileno permite la copulación con el reticulador o directamente con el accm; opcionalmente, el arileno se puede copular directamente con el reticulador. La longitud total de la cadena lineal de X o X más el reticulador es preferentemente 1-10 átomos (en el contexto de la presente invención para facilitar la interpretación de la frase "longitud total de la cadena lineal", un sistema de anillo en X o el reticulador corresponde a uno átomo, es decir, un anillo de benceno en X y un anillo de ciclohexano en el reticulador corresponde a 2 átomos). Numerosos reticuladores y accms están disponibles comercialmente y han sido descritos en la bibliografía (Thermo Scientific Crosslinking Technical Handbook, 1606073 04/2009; Bioconjugate Techniques G. Hermanson, ed, Academic Press, 1996, 785pp - enumera las proteínas portadoras comunes). Un ejemplo de un grupo de reticulación es la disolución de éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico (disponible de Sigma-Aldrich, número de catálogo 5525). Un reticulador alternativo que se puede usar para copular con haptenos que poseen un ácido carboxílico, como se ejemplifica por los Haptenos 2 y 4, es EDC y sulfo-NHS, ambos conocidos en la técnica y disponibles comercialmente.

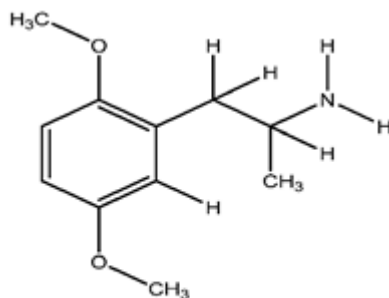
En una realización de la invención, el anticuerpo que se une específicamente a las fenetilaminas de la subfamilia 2C se produce contra un inmunógeno basado en la Estructura II que se deriva por medio de la posición 4 de la 2,5-dimetoxifenetilamina, de este modo el epítipo unido por el anticuerpo está definido por el anillo bencénico, los dos grupos metoxi y el resto etilamina.



Los anticuerpos de la subfamilia 2C se caracterizan además por el inmunógeno del que se producen y por su patrón de reactividad cruzada en el que los anticuerpos son específicos de las fenetilaminas de la subfamilia 2C y no tienen reactividad cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia DO. Por la expresión "sin reactividad cruzada" se entiende <1% de reactividad cruzada con DOB y, opcionalmente, <1% de reactividad cruzada con uno o ambos de (+)-fenetilamina y dimetilamilamina. Alternativa o adicionalmente, un anticuerpo de subfamilia 2C podría exhibir un IC_{50} de más de 20 ng/ml para 2C-B.

En otra realización de la invención, el anticuerpo que se une específicamente a las fenetilaminas de la subfamilia DO se produce contra un inmunógeno basado en la Estructura III que se deriva por medio de la posición 4 de la 2,5-dimetoxi-N-metilfenetilamina, de este modo, el epítipo unido por el anticuerpo está definido por el anillo bencénico,

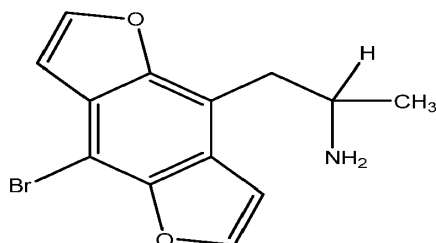
los dos grupos metoxi y el resto propan-2-amina.



Estructura III

5

Esta incluye fenetilaminas de la subfamilia DO, como se ilustra a continuación (Bromo DragonFly), en la que cada grupo metoxi se condensa con el anillo de fenilo por medio de un grupo metileno (formando un anillo de furano condensado). Las fenetilaminas de la subfamilia 2C mencionadas anteriormente también incluyen compuestos en los que cada grupo metoxi se condensa con el anillo de fenilo por medio de un grupo metileno (que también forma un anillo de furano condensado, no ilustrado):



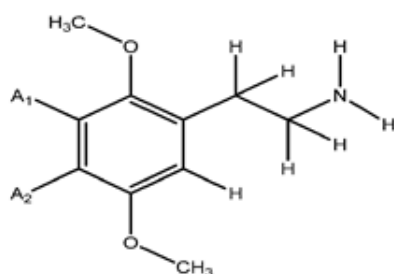
10

Los anticuerpos de la subfamilia DO se caracterizan además por el inmunógeno del que se producen y por su patrón de reactividad cruzada, en el que los anticuerpos reaccionan de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia DO y no tienen reactividad cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia 2C. Por la expresión "sin reactividad cruzada" se entiende <1% de reactividad cruzada con 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B) y, opcionalmente, <1% de reacción cruzada reactividad con uno o más de 1-(2,5-dimetoxi-4-propilfenil)etan-2-amina (2C-P), 1-(2,5-dimetoxi-4-etilfenil)etan-2-amina (2C-E), 1-(2,5-dimetoxi-4-etiltiofenil)etan-2-amina (2C-T2), 1-(4-cloro-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-C), 1-(2,5-dimetoxi-4-propiltiofenil)etan-2-amina (2C-T-7), 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)etan-2-amina (2C-D) y 1-(4-ciano-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-CN) y, más, opcionalmente, <1% de reactividad cruzada con uno o más de dimetilamilamina, metanfetamina, anfetamina y anfetamina. Alternativa o adicionalmente, un anticuerpo de la subfamilia DO podría exhibir un IC₅₀ de más de 2 ng/ml para DOB.

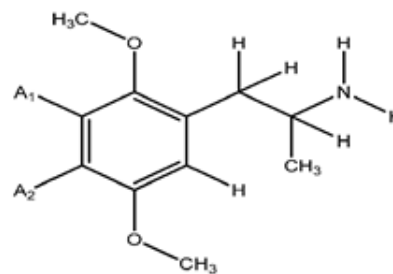
15

20

Los átomos de hidrógeno explícitos dentro de cada una de la Estructura II y la Estructura III indican que no es posible una sustitución molecular adicional en los átomos a los que están unidos estos átomos de hidrógeno explícitos. Las Estructuras IV (subfamilia 2C) y V (subfamilia DO) son moléculas representativas a las que se unen los anticuerpos específicos de epítipo de la invención:



Estructura IV



Estructura V

25

en las que uno de A₁ y A₂ es H y el otro es NO₂, Cl, BR, F, I, CH₃, CH₃-O-, CH₃-CH₂-, CH₃-CH₂-CH₂-, CH₃-CH₂-S-, (CH₃)₂-CH-S-, CH₃-CH₂-CH₂-S-, CH₃-CH₂-CH₂-CH₂-S-, (CH₃)₃-CS- o F-CH₂-CH₂-S-; o tanto A₁ como A₂ son H; o A₁ y A₂ junto con el anillo de benceno existente forman un sistema de anillo benzo[1,3]dioxano.

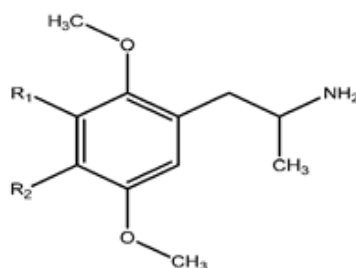
Debido a las fuerzas de atracción intermolecular, tales como el enlace de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals, a menudo hay un grado de unión o afinidad entre dos moléculas, independientemente de sus estructuras

respectivas; la persona experta reconoce que ninguna reactividad cruzada o reactividad cruzada mínima implica que, en el contexto de un inmunoensayo funcional, cualquier unión o interacción entre un anticuerpo y analitos no objetivo se encuentra en un nivel tan bajo que no compromete la integridad del inmunoensayo, es decir, se evitan los falsos positivos.

- 5 Las moléculas presentes en disoluciones o muestras biológicas in vitro que muestran reactividad cruzada hacia el anticuerpo se pueden detectar mediante inmunoensayos que incorporan dichos anticuerpos; tales moléculas son detectables a ≤ 100 ng/ml, preferentemente ≤ 50 ng/ml, más preferentemente ≤ 5 ng/ml.

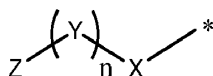
En la Figura 2 se representan ejemplos de miembros de las subfamilias de fenetilamina relevantes, con las cuales los anticuerpos de la invención reaccionan de forma cruzada.

- 10 Los anticuerpos específicos para un epítipo de la subfamilia DO se caracterizan además por ser producidos contra un inmunógeno de Estructura VI



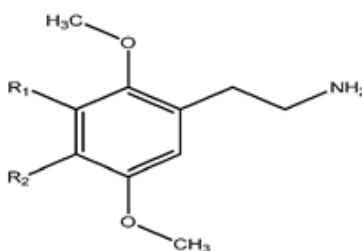
Estructura VI

en la que R_1 es H y R_2 es



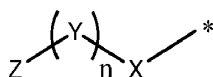
- 15 X es $-(alk)_{n1}-(A)_{n2}-$ en la que A es O, S, o $-N(H)-$, alk es un resto alquileo de C_{1-6} de cadena lineal sustituido o no sustituido o arileno y $n1$ y $n2$ son independientemente 0 o 1; Y es un grupo de reticulación y $n = 0$ o 1; Z es un accm. El grupo de reticulación y el accm de la Estructura VI son como se describe previamente para la Estructura I.

Los anticuerpos específicos para las moléculas de la subfamilia 2C se caracterizan además por ser derivados de un inmunógeno de la Estructura VII.



Estructura VII

- 20 en la que R_1 es H y R_2 es



- 25 X es $-(alk)_{n1}-(A)_{n2}-$ en la que A es O, S, o $-N(H)-$, alk es un resto alquileo de C_{1-6} de cadena lineal sustituido o no sustituido o arileno y $n1$ y $n2$ son independientemente 0 o 1; Y es un grupo de reticulación y $n = 0$ o 1; Z es un accm. El grupo de reticulación y el accm la Estructura VII son como se describe anteriormente para la Estructura I.

También se describen los inmunógenos de las Estructuras VI y VII en las que X es $-(alk)_{n1}-(A)_{n2}-$ en la que A es O, S, o $-N(H)-$, alk es un resto alquileo de C_{1-6} lineal sustituido o no sustituido o arileno y $n1$ y $n2$ son independientemente 0 o 1; Y es un grupo de reticulación y $n = 0$ o 1; Z es un accm. El grupo de reticulación y el accm de las Estructuras VI y VII son como se describe anteriormente para la Estructura I.

La invención describe además un sustrato con el que interaccionan los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos pueden interaccionar con el sustrato, por ejemplo, por adsorción pasiva o se pueden unir químicamente al sustrato unido mediante, por ejemplo, enlaces covalentes. Tal unión covalente generalmente requiere la introducción inicial de un compuesto químicamente activo unido covalentemente a la superficie del sustrato antes de la adición del anticuerpo. El propio anticuerpo también puede requerir la adición de un grupo de activación química para lograr la unión del sustrato. Estos requisitos son bien conocidos en la técnica. El sustrato puede ser cualquier medio capaz de adsorber o unirse a un anticuerpo, por ejemplo, una perla o nanopartícula (opcionalmente activada químicamente) pero es, preferentemente, de una conformación plana (opcionalmente activada químicamente) tal como un biochip.

Un biochip es un sustrato delgado, similar a una oblea, con una superficie plana que puede estar hecho de cualquier material apropiado, como vidrio o plástico, pero preferentemente está hecho de cerámica. El biochip se puede activar químicamente antes de la unión del anticuerpo o es susceptible a la adsorción pasiva de anticuerpos. La persona experta en el desarrollo de biochips para aplicaciones de inmunoensayo reconocerá que una superficie plana a alta resolución, por ejemplo, si usa un microscopio electrónico de barrido, no es perfectamente "plana", sino que tendrá una superficie irregular, siendo el aspecto importante que la superficie "aproximadamente" plana es apropiada para la aplicación. Se puede añadir opcionalmente un revestimiento de microcapa de material a la superficie plana del sustrato antes de la colocación del anticuerpo. Se puede revestir la superficie superior o ambas superficies del sustrato. Como los anticuerpos de la invención son selectivamente específicos para las subfamilias 2C o DO, se pueden colocar dos o más conjuntos de anticuerpos en el mismo sustrato plano en localizaciones discretas (denominadas "localizaciones espacialmente direccionables"). Un inmunoensayo que incorpora los anticuerpos de la invención en un solo sustrato permite el cribado competente de productos biológicos y muestras medioambientales determinando no solo la presencia de cualquier fenetilamina de las subfamilias 2C y DO en la muestra, sino también a que subfamilia de fenetilamina (s) pertenece; esto hace que la subsecuente etapa confirmatoria por espectrometría de masas, si se requiere, sea menos compleja analíticamente. También se pueden incorporar otros anticuerpos específicos del compuesto o genéricos del compuesto sobre el sustrato, tales como los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con la metanfetamina, la anfetamina y/o la MDMA.

Métodos generales, ejemplos y resultados

Preparación de haptenos, inmunógenos y agentes de detección

En inmunología, los haptenos se definen como sustancias químicas que por sí mismas no pueden provocar respuestas inmunes; requieren copulación química con moléculas inmunogénicas más grandes (materiales/moléculas portadoras que confieren antigenicidad o 'accm'), para ser capaces de inducir una respuesta inmune.

Los accms apropiados comúnmente contienen segmentos de poli(aminoácido) e incluyen polipéptidos, proteínas y fragmentos de proteínas. Los ejemplos ilustrativos de materiales portadores que confieren antigenicidad son hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina bovina (BTG), albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina de huevo, gammaglobulina bovina o BSA cationizada. Alternativamente, se pueden emplear poli(aminoácidos) que tienen un número suficiente de grupos amino disponibles, tales como lisina, al igual que otros materiales poliméricos sintéticos o naturales que llevan grupos funcionales reactivos. Además, se pueden conjugar carbohidratos, levaduras o polisacáridos con el hapteno para producir un inmunógeno.

Los haptenos también se pueden copular con un agente de marcado detectable tal como una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), una sustancia que tiene propiedades fluorescentes o un marcador radiactivo para la preparación de agentes de detección para uso en los inmunoensayos. La sustancia fluorescente puede ser, por ejemplo, un residuo monovalente de fluoresceína o un derivado de la misma.

La conjugación de haptenos se puede realizar usando métodos estándar de conjugación tales como anhídrido mixto, EDC o activación de succinimidilo de los haptenos. Para confirmar que se ha conseguido una conjugación apropiada del hapteno con el material portador, antes de la inmunización, cada inmunógeno se evalúa usando espectroscopia de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser UV asistida por matriz (MALDI-TOF MS).

Procedimiento general para el análisis MALDI-TOF de inmunógenos

La espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó con un espectrómetro de masas de desorción láser Voyager STR Biospectrometry Research Station acoplado con extracción retardada. Una alícuota de cada muestra a analizar se diluyó en ácido trifluoroacético acuoso (TFA) al 0.1% para crear disoluciones de muestra de 1 mg/ml. Las alícuotas (1 μ l) se analizaron usando una matriz de ácido sinapínico y se usó albúmina de suero bovino (Fluka) como un calibrante externo.

Preparación de antisueros.

Para generar antisueros policlonales, un inmunógeno de la presente invención se mezcla con adyuvante de Freund y la mezcla se inyecta en un animal receptor, tal como conejo, oveja, ratón, cobaya o caballo. Las ovejas son el animal receptor preferido. Se realizan inyecciones adicionales (refuerzos) y se toma una muestra del suero para evaluar el título del anticuerpo. Cuando se ha alcanzado el título óptimo, el animal receptor se sangra para producir

un volumen apropiado de antisuero específico. El grado de purificación de anticuerpo requerido depende de la aplicación prevista. Para muchos propósitos, no hay ningún requisito para la purificación; sin embargo, en otros casos, como cuando el anticuerpo se debe inmovilizar en un soporte sólido, se pueden introducir etapas de purificación para retirar el material no deseado y eliminar la unión no específica.

5 Desarrollo del inmunoensayo

El procedimiento de desarrollar un inmunoensayo es bien conocido por la persona experta en la técnica. Brevemente, para un inmunoensayo competitivo en el que el analito objetivo es una molécula no inmunogénica tal como un hapteno, se realiza el siguiente procedimiento: se producen anticuerpos inmunizando un animal, preferentemente un animal mamífero, mediante la administración repetida de un inmunógeno. El suero del animal
10 inmunizado se recoge cuando el título de anticuerpo es suficientemente alto. Se añade un agente de detección a una muestra que contiene el analito objetivo y los anticuerpos producidos, y el agente de detección y el analito compiten por la unión a los anticuerpos. El procedimiento puede comprender fijar dichos anticuerpos séricos a un sustrato de soporte tal como un soporte sólido de poliestireno o un chip cerámico. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales usando técnicas estándar. La señal emitida en el inmunoensayo es proporcional a la
15 cantidad de agente de detección unido a los anticuerpos que a su vez es inversamente proporcional a la concentración del analito. La señal se puede detectar o cuantificar en comparación con un calibrador.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de (E)-1,4-dimetoxi-2-(2-nitrovinil)benceno **2**.

Se disolvió 2,5-dimetoxibenzaldehído **1** (15 g, 0.09 moles) en nitrometano (60 ml) y se añadió acetato de amonio
20 (6.96 g, 0.09 moles) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se sometió a reflujo durante 5 horas, a continuación se dejó en agitación a temperatura ambiente durante el fin de semana. El disolvente se evaporó al vacío, el residuo se recogió en diclorometano y se lavó 2 veces con agua, 4 veces con HCl 3 M y una vez con salmuera. La porción orgánica se secó a continuación sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío para dar 30 g de sólido marrón/rojo en bruto. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 5-30% de
25 diclorometano en hexano) para dar 9.87 g de (E)-1,4-dimetoxi-2-(2-nitrovinil)benceno **2** en forma de un sólido de color naranja claro.

Ejemplo 2: Preparación de 2-(2,5-dimetoxifenil)etanamina **3**

Se añadió hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄) (5.38 g, 0.14 moles) en porciones a tetrahidrofurano anhidro (250 ml) y a continuación se añadió gota a gota (E)-1,4-dimetoxi-2-(2-nitrovinil)benceno **2** (9.87 g, 0.047 mol) disuelto en
30 tetrahidrofurano anhidro (150 ml). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 4 horas y a continuación se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Para enfriar la mezcla de reacción, se añadieron lentamente agua (5 ml) seguido de hidróxido de sodio 1 M (5 ml) y a continuación agua (15 ml) mientras se enfriaba. La mezcla resultante se agitó a continuación a temperatura ambiente y el precipitado blanco que se formó se retiró por filtración a través de un tapón de celite y se lavó con Et₂O. El disolvente se retiró a vacío para dar 5.76 g de 2-(2,5-
35 dimetoxifenil)etanamina **3** en bruto en forma de un aceite amarillo.

Ejemplo 3: Preparación de 2-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)etanamina **4**

Se disolvió 2-(2,5-dimetoxifenil)etanamina **3** (5.76 g, 31.78 mmol) en una mezcla de ácido acético (115 ml) y ácido nítrico (19 ml) enfriando a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0°C. La mezcla de reacción se vertió
40 sobre una mezcla de agua y hielo y se usó hidróxido de sodio 6 M para llevar el pH a alcalino. A continuación la disolución se extrajo con una mezcla (1/1) de benceno/éter. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad para dar 6.16 g de 2-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)etanamina **4** en forma de aceite en bruto marrón oscuro usado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Ejemplo 4: Preparación de 2,5-dimetoxi-4-nitrofenetilcarbamato de terc-butilo **5**

Se disolvió 2-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)etanamina **4** (6.16 g, 27 mmol) en diclorometano (40 ml) y trietilamina (7.52 ml, 54 mmol), seguido de dicarbonato de di-terc-butilo (8.91 g, 40.8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a
45 temperatura ambiente durante el fin de semana. La mezcla de reacción se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo al 0-30% en hexano que contiene cloroformo al 5%) para dar 2 g de 2,5-dimetoxi-4-nitrofenetilcarbamato de terc-butilo **5** en forma de un aceite marrón que solidificó con el tiempo.

50 Ejemplo 5: Preparación de 2,5-dimetoxi-4-aminofenetilcarbamato de terc-butilo **6**

Se disolvió 2,5-dimetoxi-4-nitrofenetilcarbamato de terc-butilo **5** (1.77 g, 7.8 mmol) en metanol (100 ml) y tetrahidrofurano (10 ml). Se añadió formiato de amonio (2.67 g, 0.042 moles) seguido, cuidadosamente, de 5% de Pd/C (460 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se filtró en un tapón de celite y el disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel
55 de sílice, acetato de etilo al 0-50% en hexano) para dar 1.19 g de 2,5-dimetoxi-4-aminofenetilcarbamato de terc-

butilo **6** en forma de un sólido rosa.

Ejemplo 6: Preparación de etanotioato de S-(3-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **7**

5 Se disolvió ácido 3-acetiltiopropiónico (210 mg, 1.4 mmoles) en piridina (3 ml) y a continuación se añadieron clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl) (324 mg, 1.69 mmoles) y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) (51 mg, 0.42 mmol) seguido de 2,5-dimetoxi-4-aminofenilcarbamato de terc-butilo **6** (500 mg, 1.69 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. El disolvente se retiró a vacío y el residuo se recogió en agua y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo 3 veces más con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo al 0-50% en hexano) para dar 475 mg de etanotioato de S-(3-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **7** en forma de un sólido blanco.

Ejemplo 7: Preparación de S-(3-((4-(2-aminoetil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropil)etanotioato **8** (Hapteno 1)

15 S-(3-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropil)etanotioato **7** (475 mg, 1.45 mmol) se disolvió en diclorometano (5 ml) y se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (5 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y a continuación se agitó durante la noche. El disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 0-30% en cloroformo) para dar 400 mg de S-(3-((4-(2-aminoetil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropil)etanotioato **8** (hapteno-1) en forma de un aceite marrón.

20 Ejemplo 8: Preparación del ácido 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoico **9**

25 Se disolvió 2,5-dimetoxi-4-aminofenilcarbamato de terc-butilo **6** (1 g, 3.37 mmol) en piridina (10 ml). Se añadieron anhídrido succínico (1.69 g, 16 mmol) y trietilamina (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a vacío y el residuo se recogió en acetato de etilo y HCl 1 M, después de la separación, la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 0-30% en cloroformo) para dar 740 mg de ácido 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoico **9** en forma de un sólido blanco.

Ejemplo 9: Preparación de (2,5-dimetoxi-4-succinamido)anfetamina **10** (Hapteno 2)

30 El ácido 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)etil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoico **9** (500 mg, 1.68 mmol) se disolvió en diclorometano (5 ml) y se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (5 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y a continuación se agitó durante la noche. El disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 0-30% en cloroformo) para dar 410 mg de (2,5-dimetoxi-4-succinamido)anfetamina **10** (hapteno-2) en forma de un aceite marrón.

Ejemplo 10: Conjugación S-(3-((4-(2-aminoetil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropil)etanotioato **8** con BSA

35 El éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico (55.3 mg) en N,N-dimetilformamida (0.6 ml) se añadió gota a gota a la albúmina del suero bovino (200 mg) disuelta en una disolución de HEPES 50 mM, pH 8.5 (20 ml) mientras se agita. La disolución resultante se agitó a 15-25°C durante 40 minutos. El exceso de éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico se retiró mediante diálisis frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2. El S-(3-((4-(2-aminoetil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropil)etanotioato de acetilo **8** (hapteno 1) (37.8 mg) se disolvió en N,N-dimetilformamida (3.78 ml). Se añadieron 3.78 ml de disolución de hidróxido de potasio 1M a la disolución de hapteno anterior mientras se agitaba durante un período de 10 minutos. A continuación se añadieron 9.45 ml de tampón de fosfato 0.2 M, pH 7.0 para apagar la reacción; Se añadieron 2.835 ml de disolución de HCl 1M para llevar el pH a 7.0. La proteína portadora modificada se añadió al hapteno activado, se balanceó durante 2 horas a +15 - +25°C, y a continuación se transfirió a +2 - +8°C y se balanceó durante 16-20 horas. El exceso de hapteno se eliminó mediante diálisis a 2-8°C contra disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2.

Ejemplo 11: Conjugación de etanotioato de S-(3-((4-(2-aminoetil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **8** con HRP

50 Se añadió gota a gota éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico (0.84 mg) en N,N-dimetilformamida (0.045 ml) a HRP (20 mg) disuelta en una disolución de HEPES 50 mM, pH 8.5 (0.8 ml) mientras se agitaba, protegido de la luz. La disolución resultante se agitó a 15-25°C durante 40 minutos. El exceso de éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico se retiró mediante diálisis frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2. La disolución se protegió de la luz durante el procedimiento. El etanotioato de S-(3-((4-(2-aminoetil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **8** (hapteno 1) (2 mg) se disolvió en N,N-dimetilformamida (0.2 ml). Se añadieron 0.2 ml de disolución de hidróxido de potasio 1 M a la disolución de hapteno anterior mientras se agitaba durante un período de 10 minutos. A continuación se añadieron 0.5 ml de tampón de fosfato 0.2 M, pH 7.0 para apagar la reacción; se añadieron 0.15 ml de disolución de HCl 1 M para llevar el pH a 7.0. La HRP modificada se añadió al hapteno activado, se balanceó durante 2 horas a +15 - +25 ° C, y a continuación se transfirió a +2 -

+8°C y se balanceó durante 16-20 horas. El exceso de hapteno se retiró con la columna PD-10 (Farmacia), se equilibró previamente con disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2, seguido de diálisis a 2-8°C frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2.

Ejemplo 12: Preparación de (E)-1,4-dimetoxi-2-(2-nitroprop-1-en-1-il) benceno **11**.

5 Se disolvió 2,5-dimetoxibenzaldehído **1** (15 g, 0.09 mol) en nitroetano (60 ml) y se añadió acetato de amonio (6.96 g, 0.09 mol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se sometió a reflujo durante 5 horas, a continuación se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se recogió en diclorometano y se lavó 2 veces con agua, 4 veces con HCl 3 M y una vez con salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad para dar 21.8 g de un sólido marrón en bruto. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 5-30% de diclorometano en hexano) para dar 14.35 g de (E)-1,4-dimetoxi-2-(2-nitroprop-1-en-1-il)benceno **11** en forma de un sólido amarillo claro.

Ejemplo 13: Preparación de 1-(2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina **12**

15 Se añadió hidruro de litio y aluminio (7.15 g, 0.19 moles) en porciones a tetrahidrofurano anhidro (300 ml) y a continuación se añadió gota a gota (E)-1,4-dimetoxi-2-(2-nitroprop-1-en-1-il)benceno **11** (14 g, 0.063 mol) disuelto en tetrahidrofurano anhidro (200 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche. Para enfriar la mezcla de reacción, se añadieron lentamente con enfriamiento agua (7 ml) seguido de hidróxido de sodio 1 M (7 ml) y a continuación agua (21 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se formó un precipitado blanco, a continuación se filtró en un tapón de celite y se lavó con éter dietílico. El disolvente se retiró a vacío para dar el 1-(2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (12.31 g) en bruto **12** en forma de un aceite amarillo.

20 Ejemplo 14: Preparación de 1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)propan-2-amina **13**

25 Se disolvió 1-(2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina en bruto **12** (12.3 g) en ácido acético (62 ml). Se añadió a esta disolución a 0°C ácido nítrico acuoso al 50% (66.5 ml) durante un período de 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0°C. La mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de hielo/agua y se usó hidróxido de sodio 6 M para llevar el pH a alcalino. A continuación, la disolución se extrajo con una mezcla (1/1) de benceno/éter, la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se evaporó para dar 14 g de 1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)propan-2-amina **13** en forma de petróleo en bruto.

Ejemplo 15: Preparación de (1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de terc-butilo **14**

30 Se disolvió 1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)propan-2-amina en bruto **13** (14 g) en diclorometano (125 ml) y se añadió trietilamina (16.16 ml, 116 mmol) seguido de dicarbonato de di-terc-butilo (19.1 g, 87 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. La mezcla de reacción se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo al 0-30% en hexano que contiene cloroformo al 5%) para dar 15.6 g de (1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de terc-butilo **14** en forma de un aceite marrón.

Ejemplo 16: Preparación de (1-(4-amino-2,5-dimetoxifenil)propan-2-il)carbamato de terc-butilo **15**

35 El (1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)propan-2-il)carbamato de terc-butilo **14** (5 g, 14.6 mmol) se disolvió en metanol (100 ml). Se añadió formiato de amonio (4.97 g, 0.078 moles) seguido, cuidadosamente, de un 5% de Pd/C (883 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se filtró en un tapón de celite y se lavó con diclorometano. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo al 0-50% en hexano) para dar 3.12 g de (1-(4-amino-2,5-dimetoxifenil)propano-2-il)carbamato de terc-butilo **15** en forma de un sólido blanquecino.

Ejemplo 17: Preparación de etanotioato de S-(3-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **16**

45 El ácido 3-acetilpropiónico (210 mg, 1.34 mmoles) se disolvió en piridina (3 ml), a continuación se añadieron hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida EDC (308 mg, 1.61 mmol) y dimetilaminopiridina (DMAP) seguido de (1-(4-amino-2,5-dimetoxifenil)propan-2-il)carbamato de terc-butilo **15** (500 mg, 1.61 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante el fin de semana. El disolvente se retiró a vacío y el residuo se recogió en agua y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo 3 veces más con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, acetato de etilo al 0-50% en hexano) para dar 480 mg de etanotioato de S-(3-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **16** en forma de un sólido blanco.

Ejemplo 18: Preparación de etanotioato de S-(3-((4-(2-aminopropil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **17** (Hapteno-3)

Se disolvió etanotioato de S-(3-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **16**

(480 mg, 1.11 mmol) en diclorometano (10 ml) y se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (5 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y a continuación se agitó durante la noche. El disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 0-30% en cloroformo) para dar 410 mg de etanotioato de S-(3-((4-(2-aminopropil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **17** (Hapteno-3) en forma de un aceite marrón.

Ejemplo 19: Preparación de ácido 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoico **18**

Se disolvió (1-(4-amino-2,5-dimetoxifenil)propan-2-il)carbamato de terc-butilo **15** (1 g, 3.22 mmoles) en piridina (10 ml) y anhídrido succínico (1.6 g, 15.9 mmoles) y trietilamina. Se añadieron (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. El disolvente se retiró a vacío y el residuo se recogió en acetato de etilo y HCl 1 M, después de la separación, la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 0-30% en cloroformo) para dar 903 mg de ácido 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoico **18** en forma de un polvo blanco.

Ejemplo 20: Preparación de 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo **19** (Hapteno 4)

El ácido 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoico **18** (576 mg, 1.40 mmol) se disolvió en diclorometano (10 ml) y se añadió ácido trifluoroacético (5 ml) gota a gota a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y a continuación se agitó durante la noche. El disolvente se retiró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, metanol al 0-30% en cloroformo) para dar 495 mg de 4-((4-(2-((terc-butoxicarbonil)amino)propil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-4-oxobutanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo **19** (Hapteno-4).

Ejemplo 21: Conjugación de etanotioato de S-(3-((4-(2-aminopropil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **17** con BSA

El éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico (55.3 mg) en N,N-dimetilformamida (0.6 ml) se añadió gota a gota a la albúmina del suero bovino (200 mg) disuelta en una disolución de HEPES 50 mM, pH 8.5 (20 ml) mientras se agita. La disolución resultante se agitó a 15-25°C durante 40 minutos. El exceso de éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico se retiró mediante diálisis frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2.

El S-(3-((4-(2-aminopropil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropil)etanotioato de acetilo **17** (Hapteno-3) (37.8 mg) se disolvió en N,N-dimetilformamida (3.78 ml). Se añadieron 3.78 ml de disolución de hidróxido de potasio 1M a la disolución de hapteno anterior mientras se agitaba durante un período de 10 minutos. A continuación se añadieron 9.45 ml de tampón de fosfato 0.2 M, pH 7.0 para apagar la reacción; Se añadieron 2.835 ml de disolución de HCl 1M para llevar el pH a 7.0. La proteína portadora modificada se añadió al hapteno activado, se balanceó durante 2 horas a +15 - +25°C y a continuación se transfirió a +2 - +8°C durante 16-20 horas. El exceso de hapteno se eliminó mediante diálisis a 2-8°C contra disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2.

El anticuerpo 1 DO se produjo contra el inmunógeno del Ejemplo 21.

Ejemplo 22: Conjugación de etanotioato de S-(3-((4-(2-aminopropil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropilo) **17** con HRP

Se añadió disolución de éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico (0.84 mg) en N,N-dimetilformamida (0.045 ml) gota a gota a HRP (20 mg) disuelto en disolución HEPES 50 mM, pH 8.5 (0.8 ml) mientras se agita protegido de la luz. A continuación, la disolución resultante se agitó a 15-25°C durante 40 minutos. El exceso de éster de NHS del ácido 4-N-maleimidometilciclohexil-1-carboxílico se retiró por diálisis frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2. Mantenga la disolución protegida de la luz durante el procedimiento. El S-(3-((4-(2-aminopropil)-2,5-dimetoxifenil)amino)-3-oxopropil)etanotioato de acetilo **17** (Hapteno-3) (2 mg) se disolvió en N,N-dimetilformamida (0.2 ml). Se añadieron 0.2 ml de disolución de hidróxido de potasio 1 M a la disolución de hapteno anterior mientras se agitaba durante un período de 10 minutos. A continuación se añadieron 0.5 ml de tampón de fosfato 0.2 M, pH 7.0 para apagar la reacción; se añadieron 0.15 ml de disolución de HCl 1 M para llevar el pH a 7.0. La HRP modificada se añadió al hapteno activado, se balanceó durante 2 horas a +15 - +25°C y a continuación se transfirió a +2 - +8°C durante 16-20 horas. El exceso de hapteno se retiró con la columna PD-10 (Pharmacia), se equilibró previamente con disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2, seguido de diálisis a 2-8°C frente a disolución salina tamponada con fosfato, pH 7.2.

Ejemplo 23: Inmunoensayo de compuestos 2C y DO y moléculas seleccionadas

a) Caracterización del anticuerpo 1 contra DOB-BSA

Actualmente se entiende que los análogos más comúnmente encontrados de la subfamilia DO son DOB, DOM, DOC

y DOI, aunque es probable que esto cambie con el tiempo.

Los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de unión mejorada se revistieron con una fracción de IgG de antisuero producido para DOB-BSA, diluida en Tris 10 mM, pH 8.5 (125 µl/pocillo). La dilución apropiada del revestimiento del anticuerpo se determinó usando técnicas de tablero de ajedrez ELISA estándar. La placa se incubó durante 2 horas a 37°C, se lavó 4 veces durante 10 minutos con disolución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 (TBST) y se secó. Las disoluciones estándar de DOB se prepararon en TBST a 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 ng/ml, y se añadieron 50 µl de cada una a los pocillos apropiados. Se añadieron 75 µl de conjugado (Ejemplo 22) diluido en tampón Tris (pH 7.2) que contenía EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, a cada uno de los pocillos. La dilución apropiada del conjugado también se determinó usando técnicas estándar de tablero de ajedrez ELISA. La placa se incubó a 25°C durante 1 hora. El exceso de conjugado no unido se retiró lavando 6 veces durante un período de 10 a 15 minutos con TBST y se secó. Se añadieron 125 µl de disolución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo de la placa que a continuación se incubó durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se terminó mediante la adición de 125 µl de H₂SO₄ 0.2 M a cada pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. Los datos generados en el ensayo se presentan en la Tabla 1. Para determinar la especificidad de los ELISA competitivos, se prepararon disoluciones estándar de una gama de compuestos estructuralmente similares en TBST. Usando las curvas de calibración generadas a partir de estos compuestos (0-40 ng/ml), se determinó la reactividad cruzada. Los resultados de este estudio en relación con el anticuerpo 1 se presentan en las Tablas 2 y 2a.

b) Caracterización de anticuerpos contra 2C-B-BSA.

Actualmente se entiende que los análogos más comúnmente encontrados de la subfamilia 2C son 2C-I, 2C-B, 2C-C, 2C-D y 2C-E, aunque es probable que esto cambie con el tiempo.

Los pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de unión mejorada se revistieron con una fracción de IgG de antisuero producido contra 2C-B-BSA, diluido en Tris 10 mM, pH 8.5 (125 µl/pocillo). La dilución apropiada del revestimiento de anticuerpo se determinó usando técnicas de tablero de ajedrez ELISA estándar. La placa se incubó durante la noche a 4°C, se lavó 4 veces durante 10 minutos con disolución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 (TBST) y se secó. Se prepararon disoluciones estándar de 2CB en TBST a 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 ng/ml, y se añadieron 50 µl de cada una a los pocillos apropiados. Se añadieron 75 µl de conjugado (Ejemplo 11) diluido en tampón Tris (pH 7.2) que contenía EDTA, D-manitol, sacarosa, timerosal y BSA, a cada uno de los pocillos. La dilución apropiada del conjugado también se determinó usando técnicas estándar de tablero de ajedrez ELISA. La placa se incubó a 25°C durante 1 hora. El exceso de conjugado no unido se retiró lavando 6 veces durante un período de 10 a 15 minutos con TBST y se secó presionando ligeramente. Se añadieron 125 µl de disolución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo de la placa que a continuación se incubó durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se terminó mediante la adición de 125 µl de H₂SO₄ 0.2M a cada pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. Los datos generados en el ensayo se presentan en la Tabla 3. Para determinar la especificidad de los ELISA competitivos, se prepararon disoluciones estándar de una gama de compuestos estructuralmente similares en TBST. Usando curvas de calibración generadas a partir de estos compuestos (0-80 ng/ml) se determinó el porcentaje de reactividad cruzada. Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 4.

Productos químicos

Los productos químicos se obtuvieron de Cayman Chemical (2C-P, 2C-E, 2C-T-2 y 2,4,5-trimetoxianfetamina), Sigma Aldrich (fenetilamina, metanfetamina y anfetamina), Toronto Research Chemicals (2C-D y 2C-C), LGC Limited (DOB, DOM, 2C-B y 2C-T-7); DON y 2C-CN se sintetizaron en los laboratorios Randox. Los productos químicos usados en procedimientos sintéticos se obtuvieron de Sigma Aldrich, Tokyo Chemical Industry Company Limited y Alfa Aesar.

Resultados

Tabla 1. Datos generados a partir de ensayos de placas de microtitulación competitivos para DOB, que emplean antisueros generados contra DOB-BSA

ng/ml	DOB		
	DO media (A450)	% de CV	% de B/Bo
0	1.939	0.3	100.0
0.625	1.251	9.4	64.5
1.25	1.126	0.1	58.1

ES 2 708 339 T3

	DOB		
ng/ml	DO media (A450)	% de CV	% de B/Bo
2.5	0.898	0.8	46.3
5	0.672	2.6	34.6
10	0.534	9.4	27.5
20	0.340	0.8	17.5
40	0.223	0.3	11.5
IC50	2.013		

A_{450} = absorbancia a 450nm
 B = absorbancia a 450nm a concentración estándar x ng/ml
 B_0 = absorbancia a 450nm a concentración estándar 0 ng/ml
 Porcentaje de B/B0 = $(B/B_0) \times 100$
 IC_{50} = concentración estándar que produce 50% de inhibición de señal máxima

Tabla 2. Resultados de reactividad cruzada de anticuerpo DO (anticuerpo 1) (la IC_{50} del DOB estándar es 2.01 ng/ml).

Sustancia	% de reactividad cruzada
1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB)	100.0
1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)propan-2-amina (DOM)	112.7
1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenil)propan-2-amina (DON)	43.1
2,4,5-trimetoxianfetamina (TMA)	9.8
Dimetilamilamina	<1.0
Metanfetamina	<1.0
Anfetamina	<1.0
(+)-Fenilamina	<1.0
1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B)	<1.0
1-(2,5-dimetoxi-4-propilfenil)etan-2-amina (2C-P)	<1.0
1-(2,5-dimetoxi-4-etilfenil)etan-2-amina (2C-E)	<1.0
1-(2,5-dimetoxi-4-etiltiofenil)etan-2-amina (2C-T2)	<1.0
1-(4-cloro-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-C)	<1.0
1-(2,5-dimetoxi-4-propiltiofenil)etan-2-amina (2C-T-7)	<1.0
1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)etan-2-amina (2C-D)	<1.0
1-(4-ciano-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-CN)	<1.0

Los compuestos indicados a continuación también se evaluaron en cuanto a su reactividad cruzada con el anticuerpo 1 de DO de la invención en las concentraciones indicadas en la tabla a continuación. No se detectó reactividad cruzada (definida como <1% de reactividad cruzada en comparación con 100% para DOB) a las concentraciones indicadas.

5 Tabla 2a. Resultados de reactividad cruzada adicional del anticuerpo DO (anticuerpo 1):

Compuesto	ng/ml
1,3-DMAA	1000
Mescalina	100
Anfetamina	100
Metanfetamina	100
MDMA	100
MDEA	100
BDB	100
MBDB	100
Fentermina	100
Mefedrona	100
Metcatinona	100
Triptamina	100
Tiramina	100
R (+)- Catinona HCl	100
S (-) Catinona HCl	100
Pseudoefedrina	100
Feniletilamina	100
Putrescina	100

Tabla 3. Datos generados de ensayos de placa de microtitulación competitiva para 2C-B, que emplean antisuero generado para 2C-B-BSA

	2C-B		
ng/ml	DO media (A450)	% de CV	% de B/Bo
0	2.255	1.4	100.0
1.25	1.958	2.5	86.8
2.5	1.785	0.5	79.2

2C-B			
ng/ml	DO media (A450)	% de CV	% de B/Bo
5	1.561	3.9	69.2
10	1.343	2.3	59.5
20	1.207	5.0	53.5
40	1.005	1.8	44.6
80	0.858	2.1	38.1
IC50	24.618		

A_{450} = absorbancia at 450nm
 B = absorbancia a 450nm a concentración estándar x ng/ml
 B_0 = absorbancia a 450nm a concentración estándar 0 ng/ml
 Porcentaje de B/B₀ = (B/B₀) x 100
 IC_{50} = concentración estándar que produce 50% de inhibición de señal máxima

Tabla 4. Resultados de la actividad cruzada de anticuerpo 2C (la IC_{50} del 2CB estándar es 24.6 ng/ml).

Sustancia	% de reactividad cruzada
2C-B	100.0
2C-P	276.8
2C-E	178.8
2C-T-2	194.6
2C-C	148.6
2C-T-7	171.0
2C-D	308.3
2C-CN	66.8
DOB	<1.0
(+)-Fenetilamina	<1.0
Dimetilamilamina	<1.0

Las tablas 2 y 4 describen los perfiles de reactividad cruzada de anticuerpos contra las subfamilias DO y 2C.

- 5 El anticuerpo descrito en la Tabla 2 se une a miembros de la subfamilia DO, pero no a miembros de la subfamilia 2C o fenetilamina.

El anticuerpo descrito en la Tabla 4 se une a miembros de la subfamilia 2C pero no a los miembros de la subfamilia DO o fenetilamina.

Los perfiles de unión únicos de cada anticuerpo permiten un inmunoensayo con reactividad cruzada de subfamilia

única; tal inmunoensayo puede tomar la forma de uno de los anticuerpos incorporados en un kit de inmunoensayo para un ensayo singleplex o un sustrato espacialmente direccionable tal como un biochip, o perlas fluorescentes individualizadas, que incorporan ambos anticuerpos para permitir un ensayo multiplex.

REIVINDICACIONES

1. Un método de inmunoensayo competitivo para detectar o determinar fenetilaminas de i) la subfamilia 2C o ii) la subfamilia DO, en el que un agente de detección compite con las fenetilaminas por unirse con un anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C o DO, comprendiendo el método:

5 a) poner en contacto una disolución, o una muestra in vitro tomada de un individuo sospechosa de contener fenetilaminas, con uno o más agentes de detección que comprenden una subestructura de fenetilamina conjugada con una enzima o molécula fluorescente y,

para i) un anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C que no reacciona de forma cruzada con fenetilaminas de la subfamilia DO, o

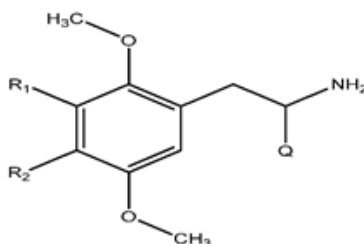
10 para ii) un anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO que no reacciona de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia 2C;

b) medir la señal o señales producidas por el uno o más agentes de detección; y

c) deducir de una curva de calibración la presencia de, o la cantidad de, fenetilaminas de la subfamilia 2C, la subfamilia DO o tanto la subfamilia 2C como DO,

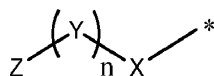
15 en el que el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C se produce contra un inmunógeno derivado a través de la posición 4 de 2,5-dimetoxifenetilamina y el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO se produce contra un inmunógeno derivado por medio de la posición 4 de 2,5-dimetoxi-N-metilfenetilamina;

20 en el que el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C se produce contra un inmunógeno de estructura I en el que Q es H y el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO se produce contra un inmunógeno de la Estructura I en la que Q es CH₃



Estructura I

en la que, R₁ es H y R₂ es



25 en la que X es -(alk)_{n1}-(A)_{n2}- en la que A es O, S o -N(H)-, alk es un resto alquileo de C₁₋₆ de cadena lineal sustituido o no sustituido o arileno y n₁ y n₂ son independientemente 0 o 1;

Y es un grupo de reticulación y n = 0 o 1;

Z es un material portador que confiere antigenicidad;

30 en la que opcionalmente o alternativamente, n₁ y n₂ = 1, A es -N(H)-, alk es un alquileo terminalmente sustituido, opcionalmente -S-CH₂-CH₂-C(O)-; Y es 4-(succinimido-N-metil)ciclohexilcarbonilo; y Z es albúmina de suero bovino (BSA);

35 en el que el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia DO no reacciona de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia 2C, en el que el anticuerpo muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, opcionalmente, menos del 1% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B), cuando se compara con el 100% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB); y

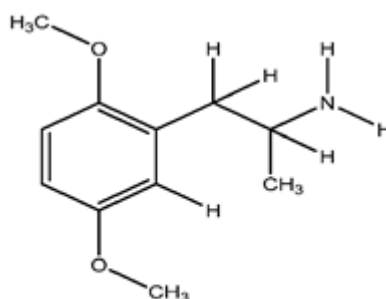
en el que el anticuerpo específico para las fenetilaminas de la subfamilia 2C no reacciona de forma cruzada con las fenetilaminas de la subfamilia DO, en el que el anticuerpo muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, opcionalmente, menos del 1% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB), cuando se compara con el 100% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B).

2. El método de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, opcionalmente, menos del 1% para una o ambas de anfetamina y metanfetamina, cuando se compara con el 100% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB) o 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B), respectivamente.

5 3. El método de inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, opcionalmente, menos del 1% para dimetilamilamina, cuando se compara con el 100% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB) o 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B), respectivamente.

10 4. El método de inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo muestra una sensibilidad (IC_{50}) de menos de 100 ng/ml, más opcionalmente, menos de 25 ng/ml, para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB) o 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B), respectivamente.

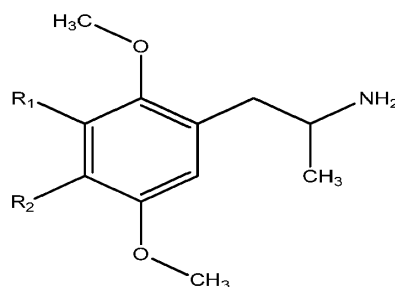
5. Un anticuerpo que se une específicamente a las fenetilaminas de la subfamilia DO, en el que el anticuerpo se produce contra un inmunógeno basado en la Estructura III que se deriva por medio de la posición 4 de la 2,5-dimetoxi-N-metilfenetilamina:



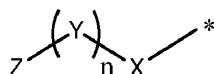
Estructura III

15 6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que las fenetilaminas se seleccionan entre las moléculas 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)propan-2-amina (DOM), 1-(2,5-dimetoxi-4-nitrofenilo)propan-2-amina (DON), 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB) y 2,4,5-trimetoxianfetamina y en el que el anticuerpo muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, opcionalmente menos del 1%, para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B), cuando se compara con el 100% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB).

7. El anticuerpo de la reivindicación 5 o 6, en el que el inmunógeno es de estructura



en la que R_1 es H y R_2 es

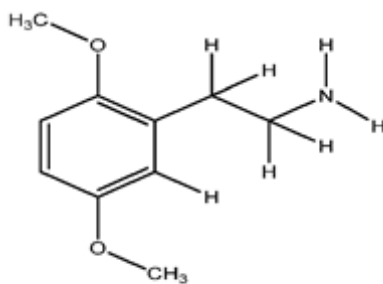


25 X es $-(alk)_{n1}-(A)_{n2}-$ en la que A es O, S, o $-N(H)-$, alk es un alquileo terminalmente sustituido, opcionalmente un resto alquileo de C_{1-6} de cadena lineal sustituido o no sustituido o arileno y n_1 y n_2 son independientemente 0 o 1;

Y es un grupo de reticulación y $n = 0$ o 1;

Z es un material portador que confiere antigenicidad.

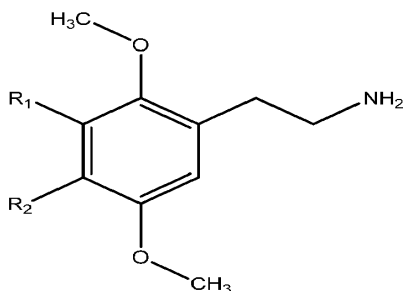
30 8. Un anticuerpo que se une específicamente a las fenetilaminas de la subfamilia 2C, en el que el anticuerpo se produce contra un inmunógeno basado en la Estructura II que se deriva por medio de la posición 4 de la 2,5-dimetoxifenetilamina.



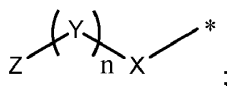
Estructura II

5 9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que las fenetilaminas se seleccionan de las moléculas 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B), 1-(2,5-dimetoxi-4-propilfenil)etan-2-amina (2C-P), 1-(2,5-dimetoxi-4-etilfenil)etan-2-amina (2C-E), 1-(2,5-dimetoxi-4-etiltiofenil)etan-2-amina (2C-T-2), 1-(4-cloro-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-C), 1-(2,5-dimetoxi-4-propiltiofenil)etan-2-amina (2C-T-7), 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)etan-2-amina (2C-D) y 1-(4-ciano-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-CN) y en la que el anticuerpo muestra una reactividad cruzada de menos del 5%, opcionalmente menos del 1%, para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)propan-2-amina (DOB), cuando se compara con el 100% para 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)etan-2-amina (2C-B).

10. El anticuerpo de la reivindicación 8 o 9, en el que el inmunógeno es de estructura



10 en la que R₁ es H y R₂ es



X es $-(alk)_{n1}-(A)_{n2}-$ en la que A es O, S, o $-N(H)-$, alk es un alquileo terminalmente sustituido, opcionalmente un grupo alquileo de C₁₋₆ de cadena lineal sustituido o no sustituido o arileno y n₁ y n₂ son independientemente 0 o 1;

15 Y es un grupo de reticulación y n = 0 o 1;

Z es un material portador que confiere antigenicidad.

11. Un sustrato que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 y 7.

12. Un sustrato que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 y 10.

20 13. Un sustrato que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 y 7; y un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 y 10.

14. El sustrato según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el sustrato es un biochip.

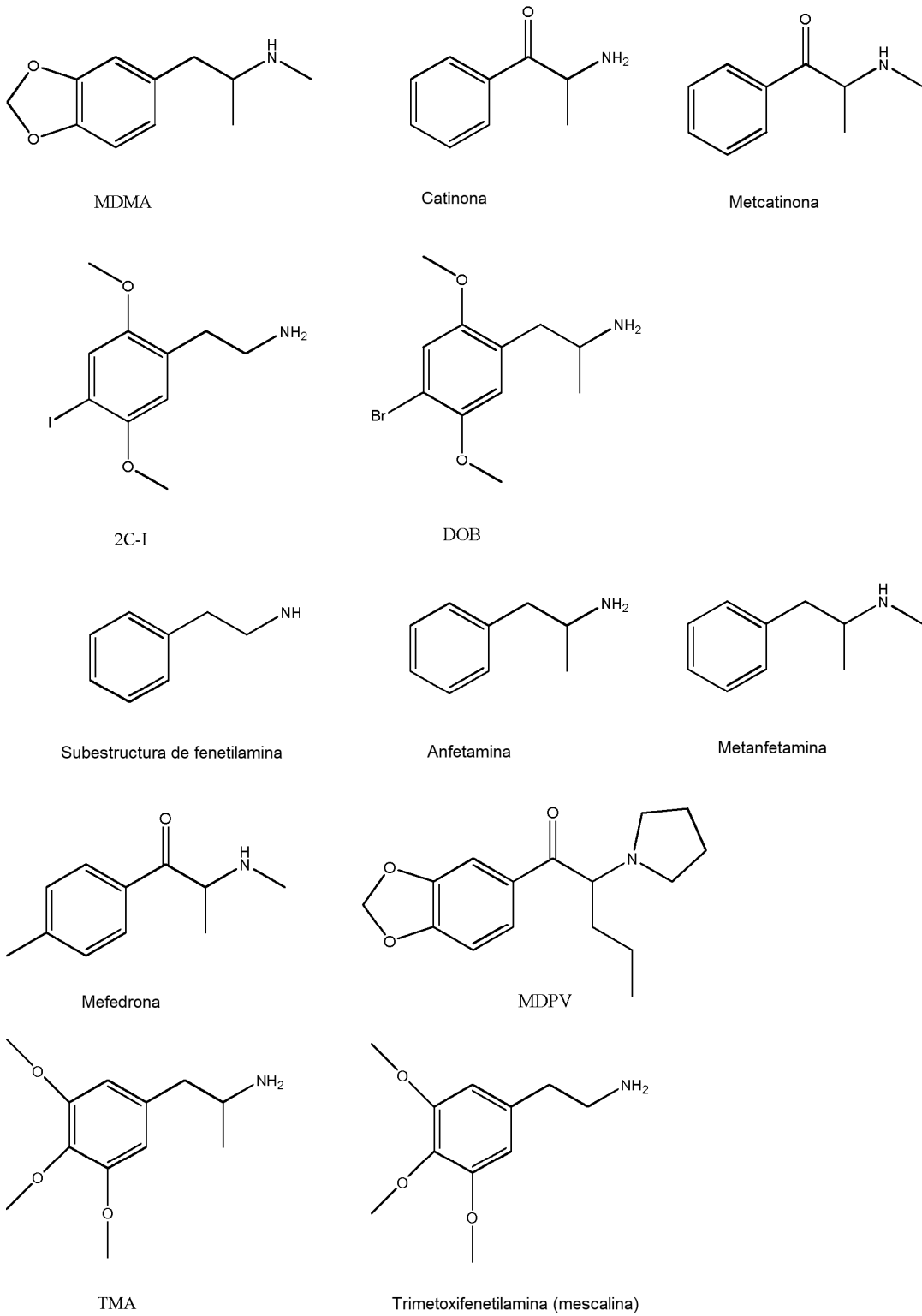
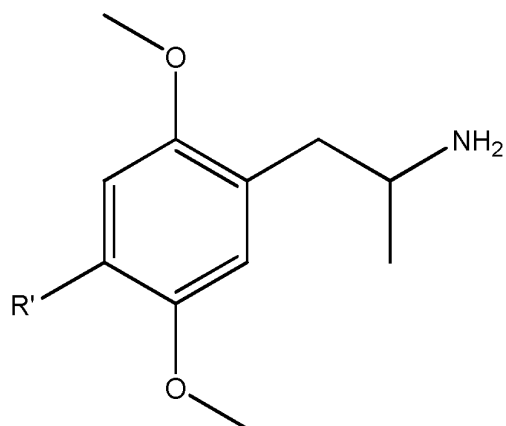
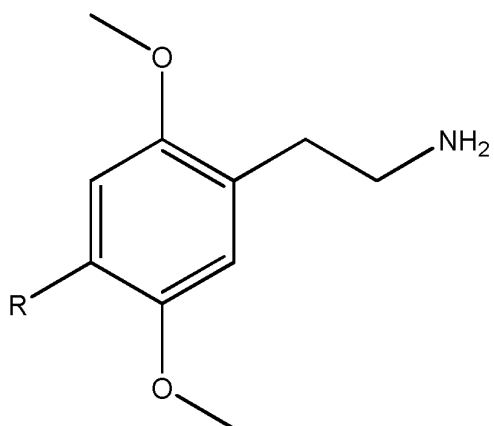


Figura 1



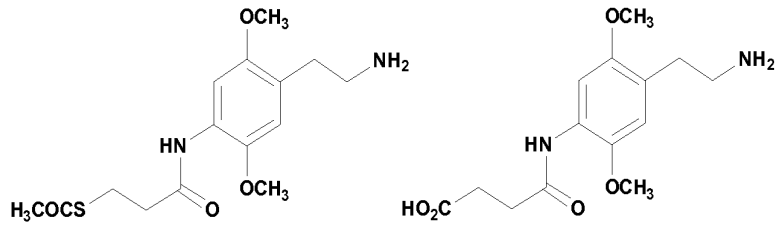
R= Nitro	2C-N
R= F	2C-F
R= H	2C-H
R= Me	2C-D
R= Br	2C-B
R= I	2C-I
R= S-Me	2C-T
R= Et	2C-E
R= Cl	2C-C
R= CN	2C-CN
R= propilo	2C-P
R= S-Et	2C-T-2
R= S-propilo	2C-T-7
R= CF3	2C-TMF
R= CH2CH2F	2C-T-21
R= S- isopropilo	2C-T4
R= isopropilo	2C-O4

Subfamilia 2C

R'= Me	DOM
R'= Br	DOB
R'= I	DOI
R'= Bu	DOBu
R'= Et	DOEt
R'= Cl	DOC
R'= CN	DOCN
R'= propilo	DOPr
R'= NO2	DON
R'= isopropilo	DOIp
R'= CF3	DOTFM
R'= CH2CH2F	DOEf
R'= O-Me	

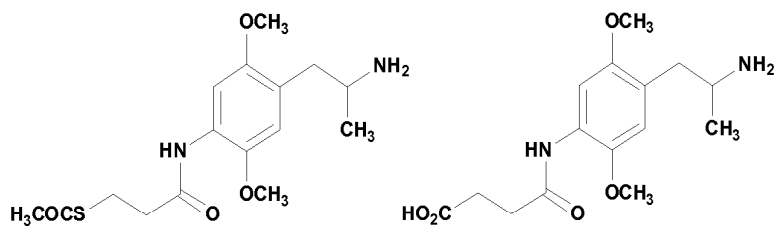
Subfamilia DO

Figura 2



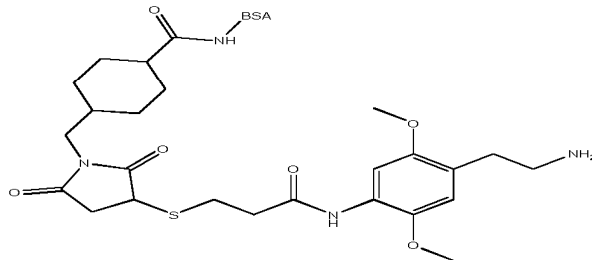
Hapteno-1

Hapteno-2

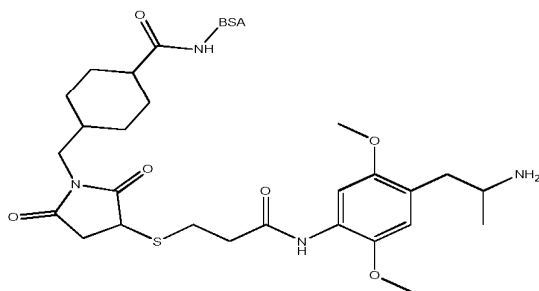


Hapteno-3

Hapteno-4



Inmunógeno del Ejemplo 10



Inmunógeno del Ejemplo 21

Figura 3

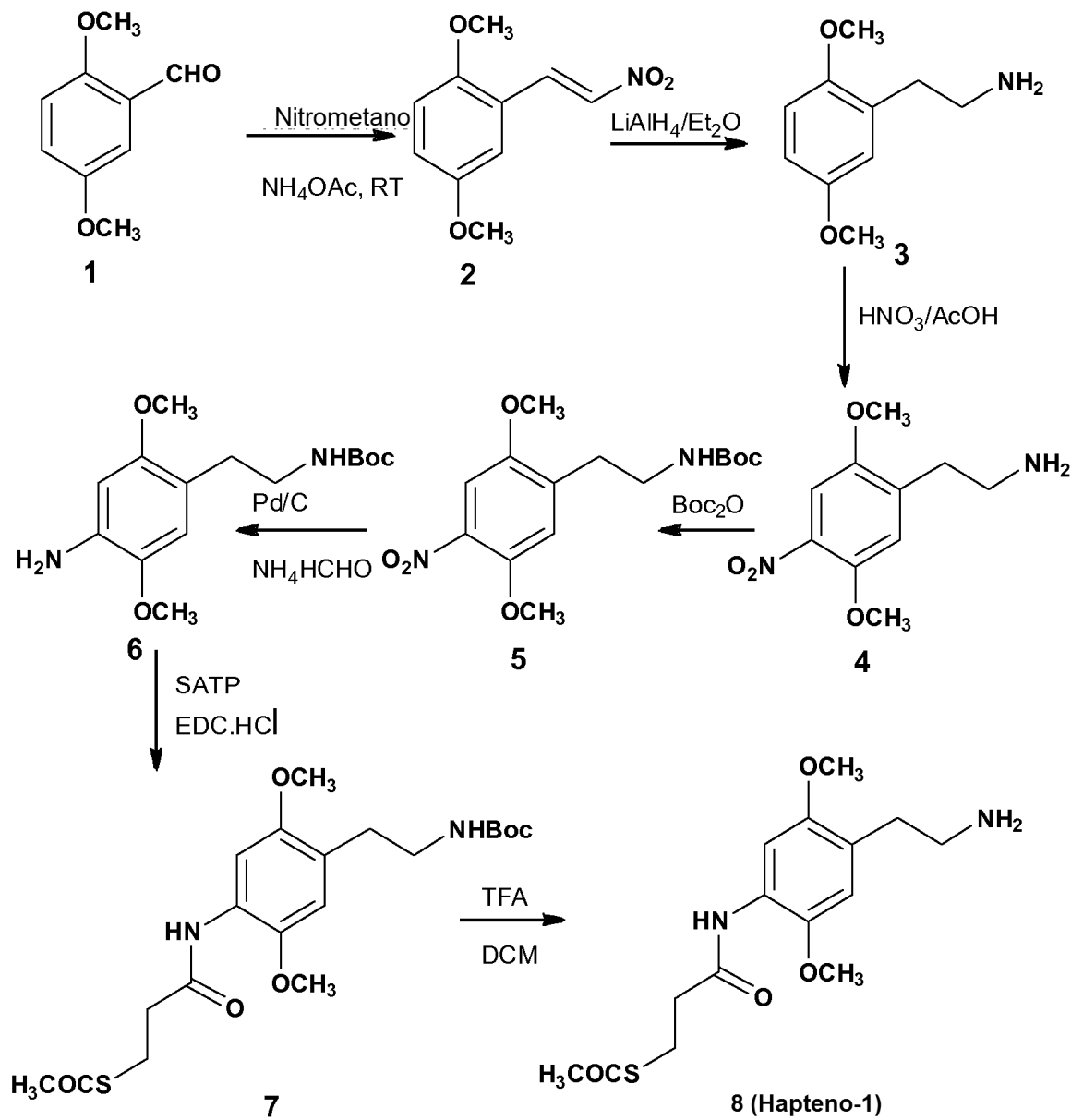


Figura 4

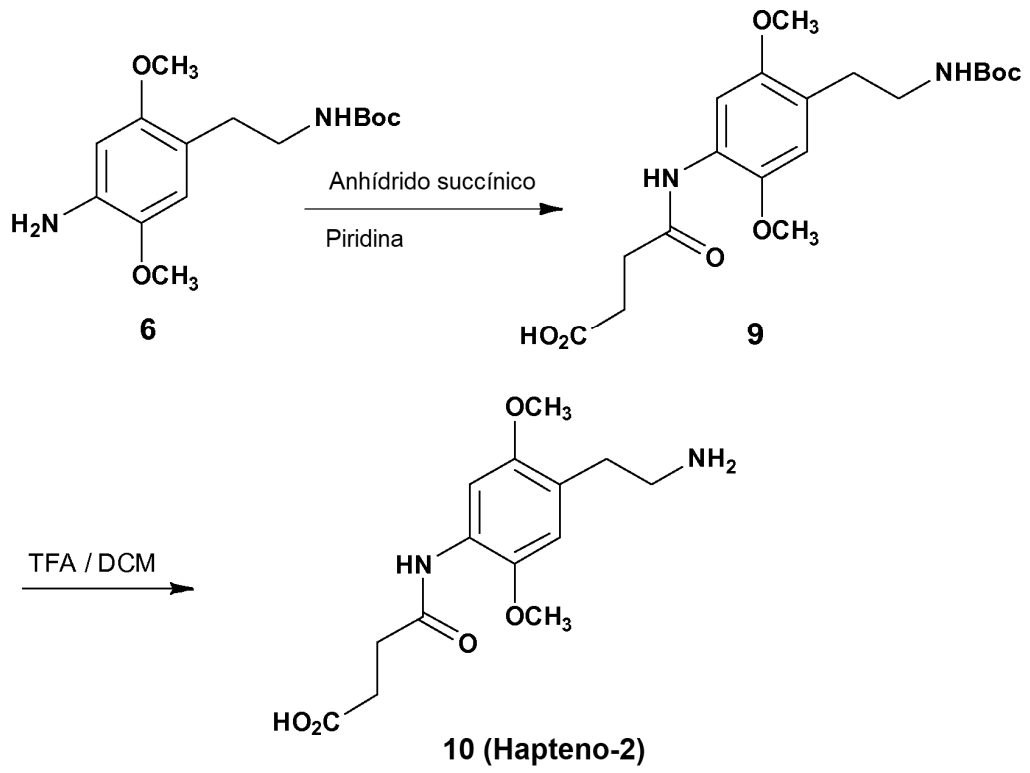


Figura 5

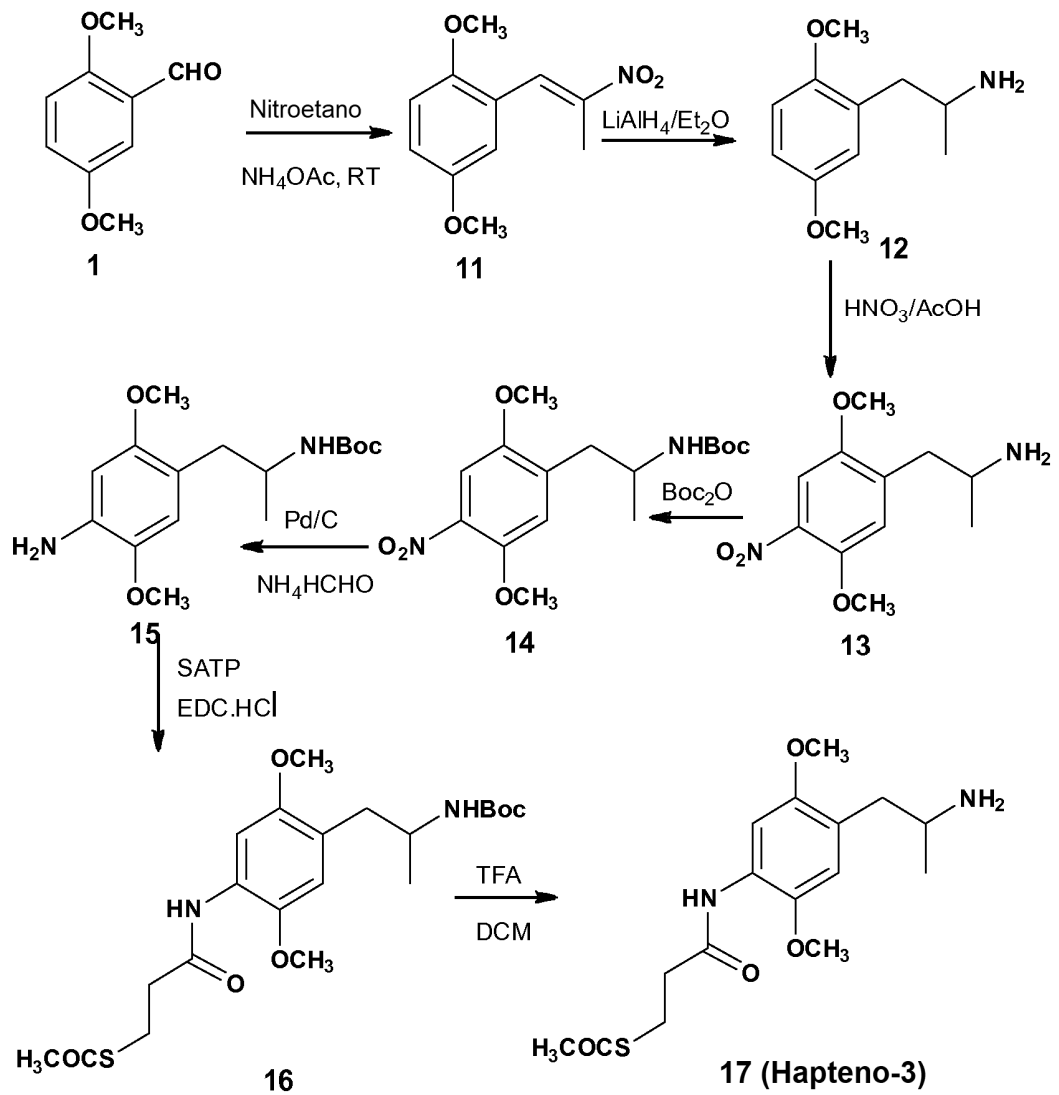


Figura 6

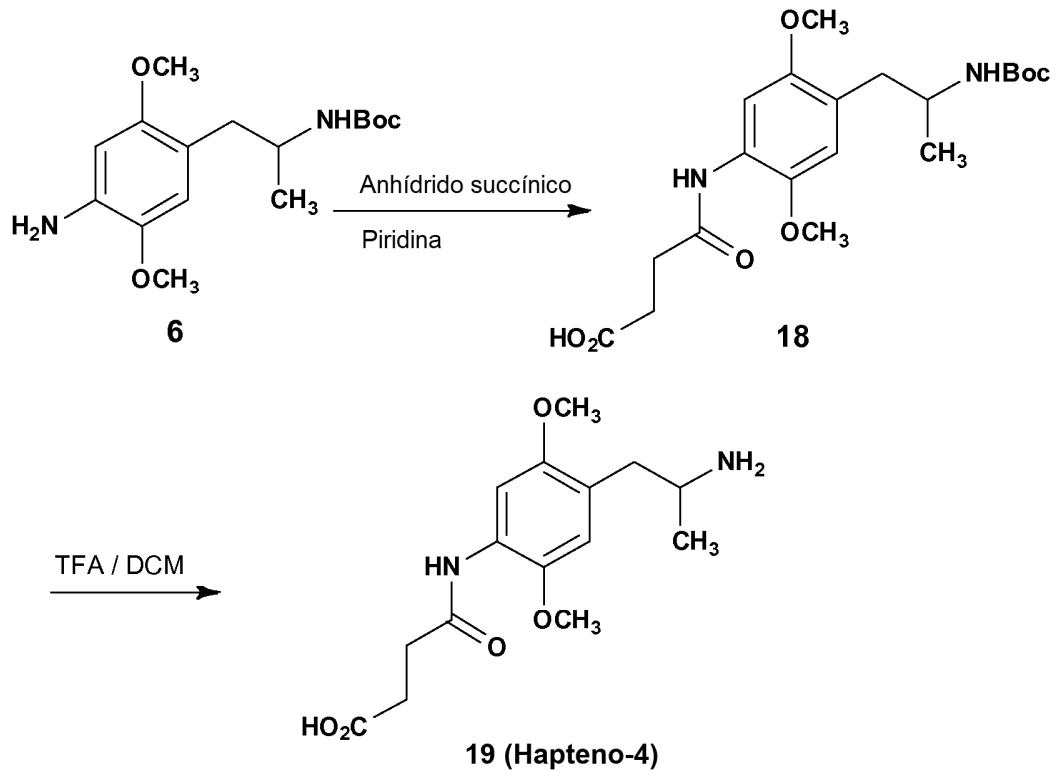


Figura 7