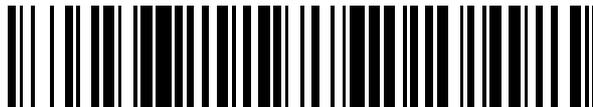


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 079**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 317/64 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

C07D 317/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2004 E 04818007 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1701950**

54 Título: **Haptenos e inmunógenos de éxtasis**

30 Prioridad:

15.12.2003 US 736018

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

24.04.2014

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
1717 DEERFIELD ROAD
DEERFIELD, IL 60015, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, YI, FENG y
YANG, YALI**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 457 079 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).

HAPTENOS E INMUNÓGENOS DE ÉXTASIS**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos y kits para detectar la presencia y/o cantidades de 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y 3,4-metilendioxietilamfetamina (MDEA) en muestras que se sospecha que contienen las mismas. En particular, la invención se refiere a haptenos, inmunógenos y ensayos para MDA, MDMA y MDEA.

El campo del diagnóstico clínico ha visto una amplia expansión en los últimos años, tanto en cuanto a la variedad de materiales de interés que pueden determinarse de manera fácil y precisa, así como en cuanto a los métodos para la determinación. A lo largo de la última década, las pruebas para detectar drogas se han vuelto comunes. Estas pruebas no son sólo para el control de delincuentes y drogadictos, sino que los empleadores también las usan para investigar a los trabajadores. En los últimos años, se ha investigado exhaustivamente el inmunoensayo basado en la reacción de un anticuerpo con un antígeno para este fin. El inmunoensayo puede clasificarse en líneas generales en radioinmunoanálisis, que usa un isótopo radioactivo, inmunoensayo enzimático (EIA) que usa una enzima y ensayos de luminiscencia, que usan marcadores fluorescentes, por ejemplo, marcadores quimioluminiscentes y de polarización de fluorescencia.

La anfetamina y la metanfetamina estimulan el sistema nervioso central y se han usado en medicina para tratar hipotensión, narcolepsia y obesidad. Debido a sus efectos estimulantes, se ha abusado de los fármacos y derivados.

Las drogas de diseño, metilendioxianfetamina (MDA), 1-3',4'-metilendioxifenil-2-propanamina, "píldoras del amor", metilendioximetanfetamina (MDMA), "Adam", "éxtasis" y metilendioxietilamfetamina (MDEA), "Eve" son entactógenos, que producen sensación de euforia y amistad. Estas drogas son populares actualmente y se denominan "drogas de fiesta". Se ha demostrado mediante varios estudios experimentales en ratas y seres humanos que estas drogas son peligrosas para los seres humanos. De hecho, se han notificado toxicidad y muertes asociadas con MDMA. Revisiones recientes también han notificado hepatotoxicidad, neurotoxicidad, psicopatología y abuso potencial de estas drogas. El uso común de estas drogas se ha generalizado en el mundo y aparecen recientemente como las drogas más populares en determinados países.

Aunque hay una necesidad para la detección de MDMA, MDA y sus metabolitos tales como 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA), etcétera, la bibliografía da a conocer métodos de detección mediante HPLC, CG-EM, que son caros y requieren mucho tiempo. Parece que los investigadores han tratado de usar tecnología de inmunoensayo existente para anfetamina/metanfetamina para la detección de MDMA y MDA debido a su reactividad cruzada. La esperanza era que el anticuerpo que reconoce anfetamina y metanfetamina también sería útil para ensayos para MDMA, MDA o sus metabolitos. Por ejemplo, se han investigado tres ensayos comerciales para anfetamina/metanfetamina, concretamente, EMIT®, FPIA y RIA, para la detección de MDA, MDMA y MDEA. (Ruangyuttikarn, *et al.*, "Comparison of three commercial amphetamine immunoassays for detection of methamphetamine, methylenedioxy-amphetamine, 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.

Sin embargo, según la bibliografía publicada, los enfoques anteriores han logrado poco éxito, si es que lo hay. Este resultado no es inesperado debido a las estructuras químicas muy diferentes entre análogos de metanfetamina y MDMA. Es decir, MDMA y MDA tienen un anillo de cinco miembros extra (metilendioxi) en comparación con metanfetamina y anfetamina, respectivamente.

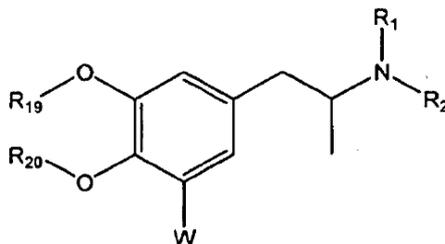
El documento EP-1 340 981 A1 da a conocer un inmunógeno que comprende un compuesto de metilendioxifenilo fusionado con KLH, BSA o BTG unida.

El documento GB 2 361 473 A da a conocer análogos de éxtasis en una forma muy genérica y el uso de estos análogos en la detección de compuestos de clase éxtasis.

Hay, por tanto, una necesidad de ensayos para la detección de las drogas de diseño mencionadas anteriormente y, en algunos casos, sus metabolitos principales. Los ensayos deben poder detectar las drogas de diseño con el fin de controlar y tratar pacientes adictos a estas drogas.

Sumario de la invención

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

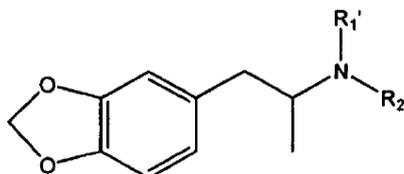


5

Fórmula I

según la reivindicación 1.

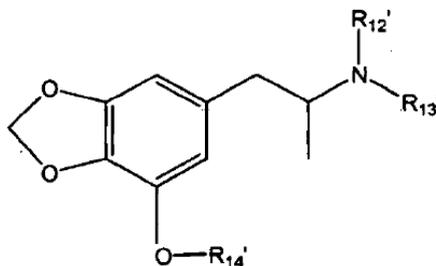
10 Otra realización de la presente invención es un compuesto de fórmula:



Fórmula II

15 según la reivindicación 9.

Otra realización de la presente invención es un compuesto de fórmula:



20

Fórmula III

según la reivindicación 22.

25 Otra realización de la presente invención es un método para determinar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y 3,4-metilendioxietilamfetamina (MDEA) tal como se explica resumidamente en las reivindicaciones 30 a 43.

30 Otra realización de la presente invención es un kit para determinar un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y 3,4-metilendioxietilamfetamina (MDEA) tal como se explica resumidamente en las reivindicaciones 44 a 46. El kit comprende (a) un anticuerpo producido contra un compuesto de fórmula I, fórmula II o fórmula III que comprende una proteína y (b) reactivos auxiliares para determinar el compuesto. El kit puede comprender además (c) un conjugado con marcador del compuesto de la fórmula anterior.

35 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de un hapteno de MDA (10).

La figura 2 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de inmunógeno de MDA-KLH

(12) o inmunógeno de MDA-BSA (14).

La figura 3 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de inmunógeno de MDMA-KLH (23) o inmunógeno de MDMA-BSA (24).

La figura 4 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de hapteno de MDMA (27).

La figura 5 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de hapteno de MDA (41), inmunógeno de MDA-KLH (42) o inmunógeno de MDA-BSA (43).

La figura 6 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de inmunógeno de MDMA-BSA (31) o inmunógeno de MDEA-BSA (35).

La figura 7 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de reactivo de partículas de MDA (44), reactivo de partículas de MDMA (45) y reactivo de partículas de MDEA (46).

La figura 8 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una síntesis de reactivo de partículas de MDA (49), reactivo de partículas de MDMA (52) y reactivo de partículas de MDEA (55).

La figura 9 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una preparación de bromoacetil-G6PDH.

La figura 10 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una preparación de un conjugado con G6PDH del compuesto (9).

La figura 11 es un esquema de reacciones que representa un ejemplo de una preparación de un conjugado con G6PDH del compuesto (40).

Descripción de las realizaciones específicas

La presente invención permite el examen eficaz de muestras para determinar la presencia de uno o más entactógenos tal como se mencionó anteriormente. Se sintetizan inmunógenos que comprenden proteínas y se usan para preparar anticuerpos específicos para 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA), 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA) y 3,4-metilendioxi-etilanfetamina (MDEA). Los anticuerpos pueden usarse en métodos para detectar las drogas mencionadas anteriormente en muestras que se sospecha que contienen las drogas. Se preparan conjugados con marcador y pueden emplearse en los métodos anteriores.

Los inmunógenos y conjugados con marcador pueden implicar un análogo de MDA, MDMA o MDEA unido a través del átomo de nitrógeno primario o a través de una unión éter en el anillo de benceno, a una proteína o un marcador, respectivamente. El grupo de unión puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos, de 4 a aproximadamente 30 átomos, sin contar el hidrógeno y puede comprender una cadena de desde 2 hasta aproximadamente 30 átomos, de 3 a aproximadamente 20 átomos, seleccionado cada uno independientemente del grupo que consiste normalmente en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo.

El número de heteroátomos en los grupos de unión oscilará normalmente entre aproximadamente 0 y aproximadamente 20, entre 1 y aproximadamente 15, entre 2 y aproximadamente 10. Los grupos de unión pueden ser alifáticos o aromáticos. Cuando están presentes heteroátomos, el oxígeno está presente normalmente como oxo u oxi, unido al carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno está presente normalmente como nitro, nitroso o amino, unido normalmente al carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre es análogo al oxígeno; mientras el fósforo está unido al carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, habitualmente como mono o diéster de fosfonato y fosfato. Alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato, y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres son funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo de unión y la molécula que va a conjugarse.

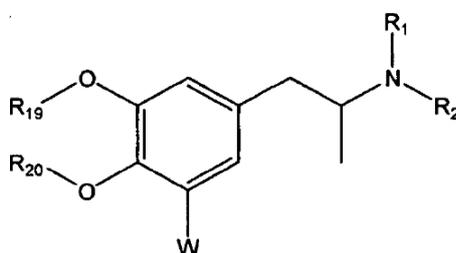
En la mayoría de los casos, cuando un grupo de unión tiene un grupo distinto de oxocarbonilo incluyendo análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, agente alquilante tal como halo o tosilalquilo, oxi (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto), oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), u olefina activa tal como una sulfona de vinilo o éster α -, β -insaturado, estas funcionalidades se unen a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando una amina y ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico se unen, se forman amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando se unen mercaptano y olefina activada, se forman tioéteres. Cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando se unen aldehído y una amina en condiciones reductoras, se forma una alquilamina. Cuando se unen un ácido carboxílico o fosfato ácido y un alcohol, se forman ésteres. Se conocen bien en la técnica diversos grupos de unión; véase, por ejemplo, Cautrecasas, J. Biol. Chem. (1970) 245:3059.

Los términos "resto de anfetamina" y "resto de metanfetamina" también incluyen derivados de anfetamina y metanfetamina tales como, por ejemplo, ésteres, amidas, haloacetamidas, y similares.

Un conjunto de derivados implica restos en los que la anfetamina o metanfetamina se protege con un grupo protector. Se conocen bien en la técnica tipos adecuados de grupos protectores y se han descrito en detalle en numerosas patentes y artículos en la bibliografía técnica. Véase, por ejemplo, "Principles of Peptide Synthesis" (M. Bodanszky, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York, Tokio (1984). Tales grupos protectores incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, t-butoxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetaminometilo (Acm), trifenilmetilo (Trt), benciloxicarbonilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, 1-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, alfa-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2-ciano-1,1-dimetil-etoxicarbonilo, bromobenciloxilo, carbamilo, formilo, y similares.

En los compuestos anteriores también se incluyen sales de los mismos, particularmente, sales que implican el grupo amina de la anfetamina y/o metanfetamina. En una realización, las sales son sales de ácido, es decir, sales formadas con ácidos tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido borhídrico, y similares, ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido DL-tartárico, etcétera.

Tal como se mencionó anteriormente, los compuestos incluyen compuestos de fórmula:



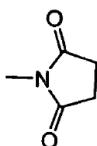
Fórmula I

según las reivindicaciones 2 a 8.

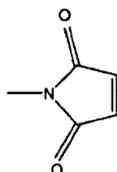
Mediante el término "alquilo inferior" quiere decirse un radical hidrocarbonado monovalente saturado ramificado o no ramificado que contiene de 1 a 10, habitualmente, de 1 a 5, átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, butilo y pentilo, y que incluye las formas normal, secundaria, terciaria, y similares, del mismo cuando sea apropiado.

Mediante el término "sales de ácido" quiere decirse sales formadas con ácidos tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido clorhídrico, y similares, ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido trifluoroacético y similares.

Mediante "-succinimidilo" quiere decirse lo siguiente:



Mediante "-maleimidilo" quiere decirse lo siguiente:



Mediante el término "marcador" quiere decirse un miembro de un sistema de producción de señales. El marcador puede detectarse directamente o es detectable a través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores son generalmente radioisotópicos, luminiscentes, particulados o enzimáticos. El marcador puede ser un poli(aminoácido) o proteína, o un compuesto distinto de poli(aminoácido), isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un catalizador, tal como una enzima, un polinucleótido que codifica para un catalizador, promotor, colorante, molécula fluorescente, molécula quimioluminiscente, coenzima, sustrato enzimático, grupo radioactivo, una molécula orgánica pequeña, secuencia de polinucleótido que puede amplificarse, una partícula tal como látex o partícula de carbono, sol de metal, unidad cristalina, liposoma, célula,

etc., que puede estar marcado o no adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, y similares.

El término "marcadores distintos de poli(aminoácido)" son aquellos marcadores que no son proteínas tales como enzimas. Un marcador distinto de poli(aminoácido) puede ser un miembro de un sistema de producción de señales. El marcador distinto de poli(aminoácido) puede detectarse directamente o es detectable á través de una reacción de unión específica que produce una señal detectable. Los marcadores distintos de poli(aminoácido) son generalmente radioisotópicos, luminiscentes, particulados, polinucleotídicos o similares. Más particularmente, el marcador puede ser isotópico o no isotópico, habitualmente no isotópico, y puede ser un polinucleótido que codifica para un catalizador, promotor, colorante, molécula fluorescente, molécula quimioluminiscente, coenzima, sustrato enzimático, grupo radioactivo, una molécula orgánica pequeña, secuencia de polinucleótido que puede amplificarse, una partícula tal como látex o partícula de carbono, sol de metal, unidad cristalina, liposoma, célula, etc., que puede estar marcado o no adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, y similares.

El sistema de producción de señales puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente el marcador. El sistema de producción de señales genera una señal que se refiere a la presencia de un entactógeno en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos requeridos para producir una señal medible. Pueden incluirse otros componentes del sistema de producción de señales en una disolución de revelador y puede incluir sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos, sustancias de unión específicas requeridas para la unión de sustancias generadoras de señales, y similares. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, y similares. El sistema de producción de señales proporciona una señal detectable mediante medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, de manera deseable mediante examen visual. A modo de ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.508.178 (Rose, *et al.*) se describen sistemas de producción de señales.

Mediante el término "portador inmunogénico" quiere decirse un grupo que, cuando se conjuga con un hapteno y se inyecta en un mamífero, inducirá una respuesta inmunitaria y provocará la producción de anticuerpos que se unen al hapteno. Los haptenos son compuestos que pueden unirse específicamente a anticuerpos correspondientes, pero no actúan por sí mismos como inmunógenos (o antígenos) para la preparación de los anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos que reconocen un hapteno contra compuestos formados 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). Se da a conocer una amplia variedad de tales portadores en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, de la columna 4, línea 57 a la columna 5, línea 5. Los portadores inmunogénicos incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas, proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, proteínas de lentes oculares y lipoproteínas, etcétera. Las proteínas ilustrativas incluyen albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana ("KLH"), ovoalbúmina, gammaglobulina bovina (BGG) y similares.

Una proteína puede unirse a un grupo de unión por medio de un grupo amina en la proteína. Las formulas anteriores muestran el átomo de nitrógeno del grupo amina de la proteína.

Pueden prepararse conjugados enzimáticos a partir de compuestos según la presente invención. En general, los grupos funcionales adecuados para unir el compuesto a la enzima son habitualmente un éster activado o agente alquilante cuando el/los aminoácido(s) que van a conjugarse en la enzima tienen grupos amino o hidroxilo y son habitualmente agentes alquilantes o similares cuando el/los aminoácido(s) que van a conjugarse en la enzima comprenden un átomo de azufre tal como, por ejemplo, una cisteína. Se dispone de un gran número de grupos funcionales adecuados para unirse a grupos amino y alcoholes tales como ésteres activados, incluyendo ésteres imídicos, ésteres sulfónicos y ésteres de fosfato, nitritos activados, aldehídos, cetonas, agentes alquilantes y similares. Se conoce bien en la técnica la conjugación de haptenos con proteínas usando estos y otros grupos de unión y se describen en revisiones tales como por ejemplo, Maggio, E.T. "Enzyme-Immunoassay" (CRC Press, Boca Raton, Fla., 1980), capítulo 4, que contiene una variedad de técnicas de conjugación; páginas 81-88.

Tras la reacción de la enzima con un compuesto tal como el que se comentó anteriormente para formar un conjugado, se purifica entonces opcionalmente el producto según se requiera. Se ha descrito en detalle la purificación y caracterización de conjugados de poli(aminoácido)-hapteno en Maggio, *et al.*; "enzyme-immunoassay" (CRC Press, Boca Raton, Fla., 1980), capítulo 4, páginas 86-88. Por ejemplo, si el conjugado es un conjugado de G6PDH mutante-hapteno, la purificación puede ser mediante diálisis contra disoluciones acuosas/orgánicas y acuosas tales como agua/DMF o agua, o mediante cromatografía por filtración en gel sobre soportes tales como Sephadex y similares.

Tal como se mencionó anteriormente, la conjugación puede implicar la unión de un hapteno a un grupo tiol libre presente en una cadena lateral de aminoácido de la enzima (por ejemplo cisteína). Una conjugación de este tipo implica alquilación del átomo de azufre del tiol mediante tratamiento con un compuesto electrófilo tal como una amida alfa o beta-insaturada, cetona, éster o similares, o un agente alquilante tal como un haluro reactivo, por ejemplo, bromuro, o sulfonato o similares o reacción con un disulfuro activo tal como un disulfuro de 2-nitro-4-

carboxifenilo. Ejemplos específicos a modo de ilustración y no de limitación incluyen alfa-bromoamidas, maleimidias, vinilsulfonas, alfa-yodocetonas y similares.

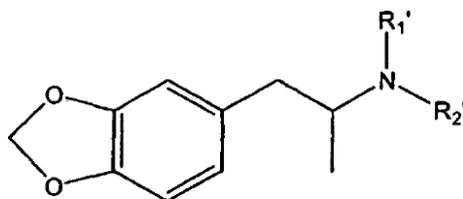
Las reacciones de conjugación con enzimas pueden resultar afectadas por varios factores. Estos incluyen, pero no se limitan a, pH, temperatura, tampón, fuerza iónica, sustancias que pueden proteger el sitio activo de la enzima, cantidad y tipo de codisolvente, tiempo de reacción y química de activación. Puede usarse habitualmente un intervalo de valores de pH de desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,5 para las reacciones de conjugación. Estas reacciones se llevan a cabo generalmente a de aproximadamente 0 a aproximadamente 40 grados C, preferiblemente a de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 grados C.

Pueden usarse varios tampones y sales, tanto solos como en combinación, para tales reacciones. Estos incluyen Tris, bicarbonato, fosfato, pirofosfato, EDTA, KCl, NaCl y muchos otros. El sitio activo puede protegerse mediante sustratos (es decir glucosa-6-fosfato para glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), cofactores (NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH) y análogos de cofactores (tio-NAD⁺, tio-NADH, tio-NADP⁺ o tio-NADPH) y compuestos que reaccionan de manera reversible con lisina (es decir piridoxal) para reducir la desactivación de la enzima durante la conjugación.

Los codisolventes que pueden potenciar la solubilidad del hapteno incluyen, pero no se limitan a, dimetilformamida, carbitol, dimetilsulfóxido, 1-metil-2-pirrolidinona y 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona. Éstos pueden ser útiles como de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 30% del volumen de reacción. Las reacciones pueden variar desde aproximadamente 15 minutos hasta muchos días, dependiendo de la química de activación. Los compuestos carboxílicos pueden activarse para formar ésteres con N-hidroxisuccinimida o su sulfo-análogo, o para formar anhídridos mixtos a través de la reacción con cloroformiato de carbitol o t-butilcloroformiato, o pueden acoplarse directamente usando carbodiimidias tales como EDAC. Para la reacción con tioles de cisteína en la enzima, el hapteno debe contener un buen grupo saliente tal como I, Br o tosilo; alternativamente, el hapteno puede contener un tiol, preferiblemente activado con 2,2'-ditiopiridina, 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), ditioeritritol (DTE) y similares.

Otro método de conjugación, descrito en Rowley, G. L., D. Leung, y P. Singh (patente estadounidense n.º 4.220.722) implica la modificación de la enzima con reactivos que contienen bromoacetilo; posteriormente se hacen reaccionar los grupos de bromo con haptenos que contienen tiol. La reacción de la enzima con el modificador de bromoacetilo y la enzima de bromoacetilo con el hapteno tiolado se someten a las mismas variables de condiciones de reacción descritas anteriormente.

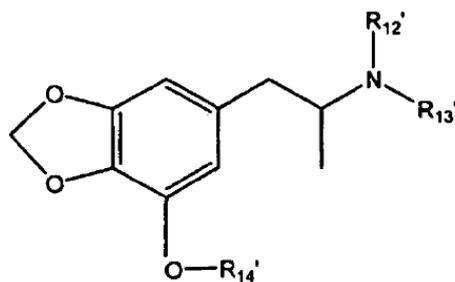
Se incluyen dentro de los compuestos anteriores de fórmula I, los compuestos de fórmula:



Fórmula II

según las reivindicaciones 9 a 20.

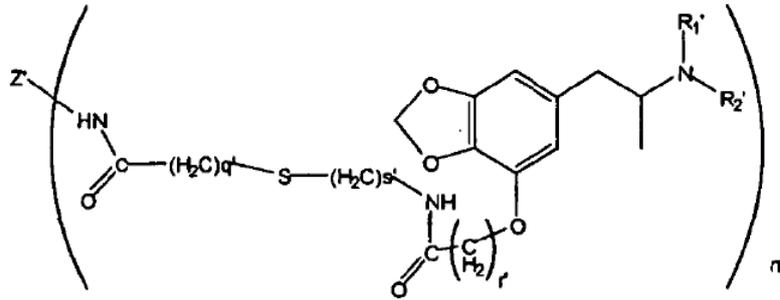
También se incluyen dentro de los compuestos anteriores de fórmula I, los compuestos de fórmula:



Fórmula III

según las reivindicaciones 22-26.

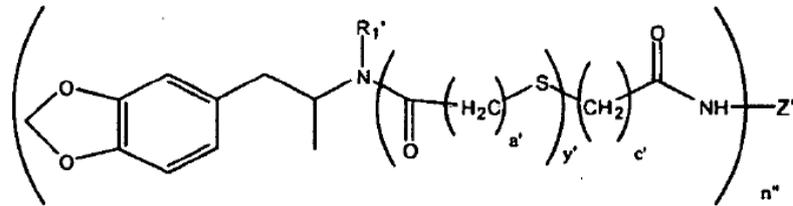
Otra realización es un compuesto de fórmula:



Fórmula IV

5 según la reivindicación 47.

Otra realización es un compuesto de fórmula:



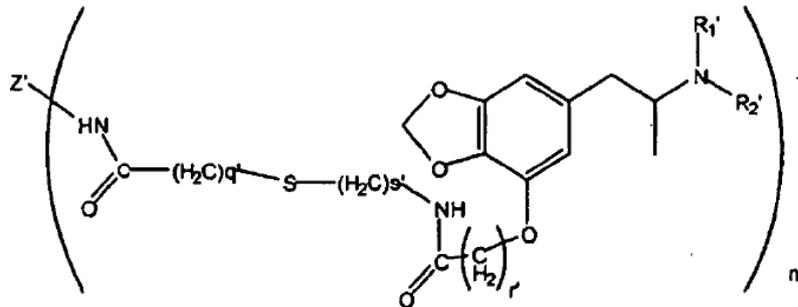
Fórmula V

10

según la reivindicación 48.

Otra realización es un compuesto de fórmula:

15

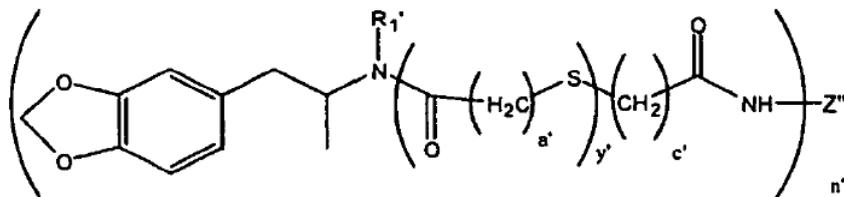


Fórmula VI

20

según la reivindicación 27.

Otra realización es un compuesto de fórmula:



Fórmula VII

25

según la reivindicación 21.

Síntesis

- 5 La síntesis de ejemplos representativos de los compuestos anteriores se comenta en el presente documento a modo de ilustración. Se sugerirán otros procedimientos sintéticos a los expertos en la técnica en vista de la descripción en el presente documento. Pueden prepararse otros compuestos dentro del alcance de la presente invención usando variantes adecuadas de los reactivos empleados a continuación. Las temperaturas y el tiempo de reacción son las habituales para el tipo de reacciones llevadas a cabo y deberían ser evidentes para los expertos en la técnica.
- 10 Se comentan dos enfoques a continuación en el presente documento, a modo de ilustración, para sintetizar cinco compuestos 10, 22, 27, 29 y 41 y sus inmunógenos. En un enfoque, se introduce un grupo de unión en el anillo de benceno de moléculas de MDA y MDMA (figuras 1-4). En el otro enfoque, se modifica el nitrógeno de amina de las moléculas anteriores (figuras 5-7).
- 15 Haciendo referencia a la figura 1, la síntesis de 10 comenzó con una condensación de material de partida 1 comercialmente disponible con nitroetano en un medio ácido tamponado tal como, por ejemplo, acetato de amonio y ácido acético para dar el nitro-compuesto 2. Se reduce el grupo nitro del compuesto 2 usando un agente reductor adecuado tal como, por ejemplo, hidruro de litio y aluminio, borohidruro de aluminio, etc., en un medio orgánico tal como, por ejemplo, un hidrocarburo aromático, un éter (por ejemplo, etil éter, THF, etc.), una formamida (por ejemplo, dimetilformamida), etcétera y combinaciones de los mismos, por ejemplo, éter/tolueno para dar la amina 3. Se protege el grupo amina de 3 con un grupo protector tal como, por ejemplo, anhídrido trifluoroacético y similares en un disolvente adecuado tal como dicloruro de metileno, un éter (por ejemplo, THF), etcétera en presencia de una base tal como una alquilamina, por ejemplo, etilamina para generar el compuesto (4). El compuesto (4) es un elemento estructural diseñado para la síntesis de haptenos de MDA, MDEA y MDMA. La desprotección selectiva del grupo metilo de 4 con un agente de desprotección tal como yoduro de trimetilsililo en condiciones básicas, por ejemplo, una amina aromática tal como piridina, quinolina, y similares, produce fenol (5). Se lleva a cabo la protección (alquilación) del fenol 5 resultante usando un agente protector tal como, por ejemplo, terc-butilbromoacetato (t-Boc), en condiciones básicas para dar el compuesto (6). Las bases adecuadas incluyen hidruros metálicos tales como, por ejemplo, NaH, CaH₂, etc., carbonato de sodio, carbonato de potasio, y similares, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, dimetilformamida (DMF), éteres orgánicos, por ejemplo, etil éter, tetrahidrofurano (THF), dioxano y similares. La reacción de 6 con un agente de desprotección para eliminar selectivamente el grupo protector de t-Boc dio el ácido (7). Tales agentes de desprotección incluyen, por ejemplo, un ácido orgánico (por ejemplo, ácido trifluoroacético y similares), un ácido inorgánico (por ejemplo, HCl y similares), etcétera. Se activa el ácido (7) mediante un agente de activación apropiado tal como, por ejemplo, dicitohexilcarbodiimida (DCC) y éster del ácido N-hidroxisuccínico (NHS), EDAC, etcétera, seguido por la reacción con amina (H₂NCH₂CH₂SSCH₃) para dar el compuesto de disulfuro (8). Se lleva a cabo la desprotección del grupo amina del compuesto (8) en condiciones básicas en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio en un alcohol tal como, por ejemplo metanol, etanol y similares. El enlace disulfuro de 9 se escinde para dar el hapteno de MDA deseado, el tiol 10. Las condiciones de escisión incluyen, por ejemplo, DTE, DTNB, TCEP-HCl y una alquilamina, por ejemplo, etilamina, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, un éter y combinaciones de los mismos.
- 45 Haciendo referencia a la figura 2, se trata el grupo amina de una proteína tal como, por ejemplo, KLH, BSA y similares con bromoacetato de succimidilo para introducir el grupo funcional bromoacetamida para la modificación de tiol dando KLH (11) modificada y BSA (13) modificada. Las condiciones de reacción incluyen, por ejemplo, una disolución tampón a pH aproximadamente de 7 a 9, aproximadamente de 7,5 a 8,5, aproximadamente de 8. Tales disoluciones tampón incluyen, por ejemplo, un tampón fosfato, por ejemplo, un dihidrogenofosfato, un hidrogenofosfato, etc., y combinaciones de los mismos. La reacción de tiol (10) (véase la figura 1) con proteína KLH 11 modificada y proteína BSA 13 modificada, da los inmunógenos deseados [inmunógeno de KLH (12) e inmunógeno de BSA (14)]. Las condiciones de reacción incluyen, por ejemplo, una disolución tampón a pH aproximadamente de 7 a 9, aproximadamente de 7,5 a 8,5, aproximadamente de 8. Tales disoluciones tampón incluyen, por ejemplo, tampón fosfato, por ejemplo, dihidrogenofosfato, un hidrogenofosfato, etc., y combinaciones de los mismos. Los inmunógenos resultantes pueden purificarse mediante técnicas de purificación apropiadas tales como, por ejemplo, cromatografía en columna, por ejemplo, SEPHADEX, etc. y similares usando un eluyente adecuado, por ejemplo, tampón fosfato, etc. La unión de una proteína al resto de unión de la molécula es habitualmente mediante los grupos amino en una proteína, donde el nitrógeno del grupo amino puede ser el nitrógeno del grupo de unión descrito anteriormente.
- 60 Haciendo referencia a la figura 3, la síntesis de hapteno de MDMA (22) comienza con alquilación del grupo amina secundaria del compuesto (4) con un agente de alquilación tal como, por ejemplo, yoduro de metilo y similares en condiciones básicas tales como una base inorgánica, por ejemplo, hidruro de potasio, hidruro de sodio, hidruro de calcio y similares en un disolvente orgánico tal como un éter, por ejemplo, tetrahidrofurano, 18-corona-6, etcétera y combinaciones de los mismos. La eliminación selectiva del grupo metoxilo de 16 dio el fenol (17). Los agentes de eliminación selectivos incluyen, por ejemplo, yoduro de trimetilsililo en condiciones básicas, por ejemplo, una amina aromática tal como piridina, quinolina y similares. La reacción de 17 con un grupo protector tal como, por ejemplo, bromoacetato de t-Boc en condiciones básicas, que incluye, por ejemplo, una base inorgánica tal como, por ejemplo,

carbonato de potasio y similares en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un éter, por ejemplo, tetrahidrofurano, etcétera produce el compuesto protegido. Se elimina el grupo de t-Boc mediante tratamiento con un agente de eliminación tal como, por ejemplo, un ácido orgánico, por ejemplo, ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un hidrocarburo clorado, por ejemplo, dicloruro de metileno para dar el ácido (19).
 5 Se activa el ácido (19) mediante un agente de activación apropiado tal como, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida (DCC) y éster del ácido N-hidroxisuccínico (NHS), EDAC, etcétera, seguido por la reacción con amina $H_2NCH_2CH_2SSCH_3$ para dar el compuesto de disulfuro (20). La eliminación del grupo protector de amina de 20 y luego la escisión del enlace disulfuro de 21 seguido por la reacción con el tiol 22 resultante con bromoacetamida de la proteína dio el MDMA-KLH (23) y el MDMA-BSA (24) deseados. Se lleva a cabo la desprotección del grupo amina
 10 del compuesto (20) en condiciones básicas en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio en un alcohol tal como, por ejemplo metanol, etanol y similares. El enlace disulfuro de 21 se escinde para dar el hapteno de MDMA deseado, el tiol (22). Las condiciones de escisión incluyen, por ejemplo, una alquilamina, por ejemplo, etilamina, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, un éter y combinaciones de los mismos. La reacción del tiol (22) con la proteína KLH modificada y la proteína BSA modificada
 15 apropiadas, da los inmunógenos deseados (23) y (24). Las condiciones de reacción incluyen, por ejemplo, una disolución tampón a pH de aproximadamente 7-9, de aproximadamente 7,5-8,5, de aproximadamente 8. Tales disoluciones tampón incluyen, por ejemplo, un tampón fosfato, por ejemplo, un fosfato de hidrógeno, un fosfato de hidrógeno, y combinaciones de los mismos. El tiol (22) también se emplea en la síntesis de conjugados de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que son conjugados enzimáticos útiles en ensayos para la detección de los
 20 compuestos de éxtasis.

Haciendo referencia a la figura 4, la síntesis del hapteno de MDMA (27) comienza con la reacción del compuesto intermedio (19) para dar la amina protegida (25). Se emplea un agente de protección adecuado tal como, por ejemplo, un agente para introducir un grupo protector de t-Boc, por ejemplo, di-terc-butildicarbonato (t-Boc)₂O, en
 25 condiciones básicas tales como, por ejemplo, una base inorgánica, por ejemplo, carbonato de potasio y similares en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol, etanol, etcétera. Se activa el grupo ácido de 25 mediante un agente de activación apropiado tal como, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida (DCC) y éster del ácido N-hidroxisuccínico (NHS), EDAC, etcétera en un disolvente orgánico adecuado tal como, por ejemplo, un éter, por ejemplo tetrahidrofurano, etcétera. Posteriormente se hace reaccionar el compuesto activado
 30 (25a) con maleimidoetilamina para dar el compuesto (26) en condiciones que incluyen un disolvente orgánico y similares. La eliminación del grupo de protección de t-Boc mediante tratamiento del compuesto (26) con un agente de eliminación tal como, por ejemplo, ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un hidrocarburo clorado, por ejemplo, dicloruro de metileno, da el producto final (27).

Haciendo referencia a la figura 5, la reacción del clorhidrato de MDA con éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 2-mercapto[S-acetil]acético da el compuesto (40). Se lleva a cabo la reacción en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un éter, por ejemplo, tetrahidrofurano y similares en presencia de una base orgánica tal como una mono, di y trialquilamina, por ejemplo, diisopropiletilamina (DIPEA). Otras bases adecuadas incluyen etilamina, dietilamina, trietilamina, etcétera. El compuesto (40) se hidroliza en condiciones básicas en tiol libre (41). Las condiciones
 40 básicas son, por ejemplo, una base inorgánica, por ejemplo, un carbonato, por ejemplo, carbonato de potasio, carbonato de sodio y similares en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol, etanol, etcétera. Se aplicó una química similar a la descrita con respecto a la figura 2 para preparar los inmunógenos de KLH (42) y BSA (43) usando el hapteno (41).

Haciendo referencia a la figura 6, la reacción de MDMA con bromoacetato de metilo en condiciones básicas dio el compuesto (28). Las bases adecuadas incluyen hidruros metálicos tales como, por ejemplo, NaH, CaH₂, etc., carbonato de sodio, carbonato de potasio y similares, en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, dimetilformamida (DMF), éteres orgánicos, por ejemplo, etil éter, tetrahidrofurano (THF), dioxano y similares. La hidrólisis de 28 seguido por la activación del ácido resultante (29) con un agente de activación adecuado tal como,
 50 por ejemplo, EDAC, NHS y similares dio el producto intermedio deseado (30). La hidrólisis puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando una base inorgánica tal como, por ejemplo, un hidróxido metálico, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y similares en un disolvente orgánico oxigenado tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol, etanol, etcétera. La reacción de 30 con BSA en una disolución tamponada tal como un tampón fosfato, por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio, etcétera (por ejemplo, 0,1 M, pH=8,0) dio el inmunógeno conjugado (31). Se midió la concentración de proteína mediante el ensayo de concentración de proteínas de BCA y se usó el método de TNBS para la determinación del número de haptenos. El conjugado tuvo una concentración de 1,74 mg/ml con un número de haptenos de 40 y se usó para producción de anticuerpos. De manera similar, se preparó un inmunógeno de MDEA (35). El MDEA-BSA tuvo una concentración de proteínas de 2,11 mg/ml con un
 60 número de haptenos de 43 y se utilizó para producción de anticuerpos.

La siguiente descripción se refiere a la síntesis de partículas de látex para su uso en un ensayo de PETINIA de éxtasis. El átomo de nitrógeno de la molécula de MDA, MDMA o MDEA se emplea para la unión a las partículas. Haciendo referencia a la figura 7, puede emplearse clorhidrato de MDA (Q=H) o clorhidrato de MDMA (Q=CH₃) o clorhidrato de MDEA (Q=C₂H₅) como la molécula de partida en la síntesis. El material de partida se combina con un reactivo de partículas, es decir un éster formado a partir de una funcionalidad de ácido carboxílico en la partícula y 1,2-epoxi-3-hidroxipropano. El producto resultante es una partícula a la que se une un resto de MDA (compuesto

44), un resto de MDMA (compuesto 45) o un resto de MDEA (compuesto 46).

Haciendo referencia a la figura 8, puede emplearse clorhidrato de MDA o clorhidrato de MDMA o clorhidrato de MDEA como la molécula de partida en la síntesis. Se protege la funcionalidad de amina del material de partida para dar el compuesto 47 (Q=H), 50 (Q=CH₃) o 53 (Q=C₂H₅) tratando el material de partida con un agente de protección adecuado tal como, por ejemplo, un agente para introducir un grupo protector de t-Boc, por ejemplo, Boc-C14. Se lleva a cabo la reacción en condiciones básicas tales como, por ejemplo, una base orgánica tal como una mono, di y trietilamina, por ejemplo, trietilamina (TEA). Otras bases adecuadas incluyen etilamina, dietilamina, amina DIPEA y similares. Se lleva a cabo la reacción en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, por ejemplo, metanol, etanol, etcétera en presencia de, por ejemplo, carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC). La eliminación del grupo de protección de t-Boc mediante tratamiento del compuesto (47, 50 ó 53) con un agente de eliminación tal como, por ejemplo, un ácido, por ejemplo, ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un hidrocarburo clorado, por ejemplo, dicloruro de metileno, da el compuesto (48) (Q=H), (51) (Q=CH₃) o (54) (Q=C₂H₅). Pueden prepararse partículas con el compuesto 48, 51 ó 54 unido haciendo reaccionar el compuesto respectivo con un reactivo de partículas que tiene una funcionalidad de 1,2-epoxi-3-hidroxipropano. Las condiciones de reacción se comentaron anteriormente con respecto a la figura 8. El producto resultante es una partícula a la que se une un resto de MDA (compuesto 49), un resto de MDMA (compuesto 52) o un resto de MDEA (compuesto 55).

Ensayos

Los ensayos de la presente invención habitualmente implican reacciones entre componentes de unión tales como un analito de éxtasis y un anticuerpo correspondiente o la unión entre un anticuerpo y un componente de unión correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo. Por consiguiente, el componente de unión puede ser una proteína, que puede ser un anticuerpo o un antígeno. El componente de unión puede ser un miembro de un par de unión específica ("miembro de sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a y se define por eso como complementario con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específica serán habitualmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específica tales como biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácido nucleico, IgG-proteína A, pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN y similares no son pares inmunológicos pero se incluyen dentro del alcance del miembro de sbp.

Por consiguiente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras de superficie específica. La unión no específica puede resultar de varios factores incluyendo interacciones hidrófobas entre moléculas. Los componentes de unión preferidos son los anticuerpos.

Los inmunógenos preparados según la presente invención pueden emplearse para preparar anticuerpos específicos para un analito de éxtasis respectivo mencionado anteriormente. Un anticuerpo es una inmunoglobulina que se une específicamente a y se define por eso como complementario con una organización espacial y polar particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede prepararse mediante técnicas que se conocen bien en la técnica tales como inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonal) o mediante la preparación de líneas celulares híbridas continuas y la recogida de la proteína secretada (monoclonal) o mediante la clonación y expresión de secuencias de nucleótido o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican para al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.

Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los 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 cuando sea apropiado, siempre que se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.

Se obtiene antisuero que contiene anticuerpos (policlonales) mediante técnicas bien establecidas que implican inmunización de un animal, tal como un conejo, cobaya o cabra, con un inmunógeno apropiado y obteniendo antisueros de la sangre del animal inmunizado tras un periodo de espera apropiado. Parker, *Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., EE. UU., 1976), Butler, *J. Immunol. Meth.* 7:1-24 (1975); Broughton y Strong, *Clin. Chem.* 22:726-732 (1976); y Playfair, *et al.*, *Br. Med. Bol.* 30:24-31 (1974) proporcionan revisiones del estado de la técnica.

También pueden obtenerse anticuerpos mediante técnicas de hibridación de células somáticas, denominándose comúnmente tales anticuerpos como anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse según las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de técnicas de anticuerpos monoclonales 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). Se inyectan muestras de una preparación de inmunógeno apropiada en un animal tal como un ratón y, tras un tiempo

suficiente, se sacrifica al animal y se obtienen células del bazo. Alternativamente, pueden sensibilizarse las células del bazo de un animal no inmunizado con el inmunógeno *in vitro*. Pueden comprimirse los cromosomas de células del bazo que codifican para las secuencias de bases para las inmunoglobulinas deseadas fusionando las células del bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea de células de mieloma. Se permite que las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, crezcan en un medio selectivo, tal como medio HAT, y se hacen crecer las células inmortalizadas supervivientes en tal medio usando condiciones de dilución limitantes. Se hacen crecer las células en un recipiente adecuado, por ejemplo, pocillos de microtitulación, y se examina el sobrenadante para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

Existen diversas técnicas para potenciar la producción de anticuerpos monoclonales, tales como inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células, y recogiendo el líquido ascítico. Cuando se recoge una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal en el líquido ascítico, el anticuerpo se recoge de la sangre del huésped. Alternativamente, las células que producen el anticuerpo deseado pueden hacerse crecer en un dispositivo de cultivo celular de fibra hueca o un dispositivo de frasco centrifugador, ambos bien conocidos en la técnica. Existen diversas maneras convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales de otras proteínas y otros contaminantes (véase Köhler y Milstein, citado anteriormente).

En otro enfoque para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica para sitios de unión del anticuerpo puede extraerse del ADN del cromosoma e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de unión del anticuerpo correspondientes.

En general, los anticuerpos pueden purificarse mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía en DEAE, cromatografía ABx y similares, filtración, etcétera.

Un análogo de analito es un analito modificado, que puede competir con el analito semejante por un receptor, proporcionando la modificación medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo de analito diferirá habitualmente del analito en más de la sustitución de un hidrógeno con un enlace que une el análogo de analito a un núcleo o marcador, pero no es necesario. El análogo de analito puede unirse al receptor de manera similar al analito. El análogo puede ser, por ejemplo, un conjugado con marcador del analito, un anticuerpo dirigido contra el idiotipo de un anticuerpo frente al analito y similares.

Tal como se indicó anteriormente, los análogos de analito incluyen conjugados con marcador, que pueden prepararse a partir de determinados de los haptenos descritos anteriormente mediante la incorporación de un marcador deseado. Los dos componentes pueden unirse entre sí, opcionalmente a través de un grupo de unión, para formar una estructura individual. La unión puede ser o bien unión covalente tal como mediante una conexión directa, por ejemplo, un enlace químico, entre los componentes o entre los componentes y un grupo de unión, o bien unión no covalente que implica unión específica entre miembros complementarios del par de unión específica (sbp) que se unen a los componentes. Los procedimientos empleados para la conjugación se conocen bien en la técnica.

Normalmente, para unión covalente, uno o más de los componentes contiene un grupo funcional adecuado para la unión a uno o más de los otros componentes. Los grupos funcionales adecuados para unir los componentes pueden ser funcionalidades de carbonilo, tanto oxocarbonilo, por ejemplo, aldehído como distintas de oxocarbonilo (incluyendo análogos de nitrógeno y azufre) por ejemplo, carboxilo, amidina, amidato, tiocarboxilo y tionocarboxilo. Funcionalidades alternativas de oxo incluyen halógeno activo, diazo, mercapto, olefina, particularmente olefina activada, amino, fosforo y similares. Los ésteres activados o agentes alquilantes son de interés particular. Se conocen bien en la técnica detalles de técnicas para unir moléculas entre sí. Véanse, por ejemplo, Matthews, *et al.*, Anal. Biochem. (1985) 151:205-209; Engelhardt, *et al.*, solicitud de patente europea n.º 0302175 y patente estadounidense n.º 3.817.837.

Tal como se indicó anteriormente, los componentes, es decir, hapteno y marcador, de los reactivos pueden unirse entre sí de manera no covalente. Por ejemplo, puede incorporarse una molécula orgánica pequeña tal como, por ejemplo biotina, incluyendo bis-biotina, fluoresceína o similares, en uno de los componentes y puede unirse el otro componente a un componente de unión para la molécula orgánica pequeña tal como, por ejemplo, respectivamente, estreptavidina, anti fluoresceína o similares. La unión de los componentes de unión da como resultado la unión no covalente de los componentes entre sí.

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

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos de antígenos o haptenos que usan un analito marcado 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 tipo sándwich de dos sitios, por ejemplo, ensayos 5 inmunoradiométricos, ensayos inmunofluorométricos, ensayos inmunoquimioluminométricos, ensayos ELISA, etcétera. Otro grupo de inmunoensayos incluye precipitación, inmunoensayos nefelométricos y turbidimétricos, inmunoensayos de aglutinación de partículas, inmunoensayos por recuento de partículas y similares. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos libres de separación en los que los reactivos marcados modulan la señal del marcador en reacciones de unión de antígeno-anticuerpo. Otro grupo de ensayos incluye ensayos competitivos 10 de reactivo limitado de anticuerpo marcado para hapteno o antígeno que evitan el uso de antígenos o haptenos marcados problemáticos. En este tipo de ensayo, es importante que el analito inmovilizado a la fase sólida esté presente en una cantidad constante, limitada. El reparto de un marcador entre el analito inmovilizado y el analito libre depende la concentración del analito en la muestra.

Los haptenos, conjugados con marcador y anticuerpos mencionados anteriormente pueden emplearse para llevar a 15 cabo un inmunoensayo para los analitos de éxtasis MDA, MDMA y/o MDEA. Los ensayos pueden realizarse o bien sin separación (homogéneos) o bien con separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Syva Company, San José, CA) dado a conocer en Rubenstein, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.817.837, de la columna 3, línea 6 a la 20 columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los dados a conocer en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.996.345, de la columna 17, línea 59 a la columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tal como los dados a conocer en Maggio, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.233.402, de la columna 6, línea 25 a la columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") tal como se da a conocer, por ejemplo, entre otros, en la patente estadounidense n.º 5.354.693; etcétera.

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por modulador enzimático ("EMMIA") comentado 25 por Ngo y Lenhoff, *FEBS Lett.* (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia marcado con sustrato ("SLFIA") dado a conocer por Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1984) 22:895-904; el inmunoensayos de enzima donante combinada ("CEDIA") dados a conocer por Khanna, *et al.*, *Clin. Chem. Acta* (1989) 185:231-240; 30 inmunoensayos homogéneos de partícula marcada tales como inmunoensayo de inhibición turbidimétricos potenciados con partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas ("PETIA"), etc.; y similares.

Ensayos heterogéneos a modo de ejemplo son el análisis de inmunoadsorción unido a enzimas ("ELISA") 35 comentado en Maggio, E.T. citado anteriormente; el radioinmunoanálisis, dado a conocer en Yalow, *et al.*, *J. Clin. Invest.* 39:1157 (1960), etcétera.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso 40 ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); luminoinmunoensayos ("LIA"); etcétera. 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 con anticuerpos tras la unión de un antígeno o hapteno. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor semiconductor, ensayos de inmunosensor 45 transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico, ensayos de electrodo amperométrico y similares.

Los reactivos anteriores pueden emplearse además en inmunoensayos de múltiples analitos donde uno o más 50 analitos entactógenos pueden someterse a detección junto con uno o más de otros analitos tales como otras drogas y similares. Tales sistemas de múltiples analitos se describen en la patente estadounidense n.º 5.135.836.

Los ensayos homogéneos o heterogéneos, particularmente inmunoensayos enzimáticos e inmunoensayos de 55 polarización de fluorescencia, se llevan a cabo normalmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, generalmente el que proporciona la sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir desde el 0 hasta aproximadamente el 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 60 intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH será habitualmente un término medio entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tal como miembros del sistema de producción de señales, etcétera.

Pueden usarse diversos tampones para alcanzar el pH deseado y mantener el pH durante la determinación. Los 65 tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbital y similares. El tampón particular empleado no es crítico para esta invención, pero puede preferirse uno u otro tampón en un ensayo individual. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en el método según la presente invención. Por ejemplo, además de tampones el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. Frecuentemente, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; disolvente orgánicos tales como formamida;

sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; tensioactivos, particularmente tensioactivos no iónicos; potenciadores de unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; o similares.

5 Pueden aplicarse uno o más periodos de incubación al medio a uno o más intervalos incluyendo cualquier intervalo entre la adición de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio se incuba habitualmente a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan entre aproximadamente 5° y aproximadamente 99°C, habitualmente entre 10 aproximadamente 15°C y aproximadamente 70°C, más habitualmente entre 20°C y aproximadamente 45°C. El periodo de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 6 horas, habitualmente, desde aproximadamente 2 segundos hasta aproximadamente 1 hora, más habitualmente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos. El periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y de la velocidad de unión de los diversos reactivos, lo que se determina mediante la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de la velocidad de disociación. Las temperaturas durante las mediciones oscilarán generalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50°C, más habitualmente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40°C.

20 La concentración del analito de éxtasis que puede someterse a ensayo varía generalmente desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, más habitualmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta 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.

25 La concentración de analitos que van a detectarse variará generalmente desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, más habitualmente desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-14} M. En general, se establece un nivel de punto de corte predeterminado para cada analito que se sospecha que está en una muestra. El nivel de punto de corte predeterminado particular se determina generalmente en un analito basándose en el analito. Los expertos en la técnica son bien conscientes de los factores relativos a la selección de niveles de punto de corte predeterminados. Por ejemplo, para muchas drogas, los niveles de punto de corte se determinan por SAMSA, una agencia del Departamento de Salud y Servicios Humanos. La naturaleza del sistema de producción de señales puede ser una consideración en la determinación de los niveles de punto de corte predeterminados de algunos analitos. Otra consideración es que la variación esperada en la concentración de los analitos que es importante debe proporcionar una diferencia de señal medible de manera precisa.

35 Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán generalmente por el intervalo de concentración de interés del analito entactógeno. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos se determinará normalmente de manera empírica para optimar la sensibilidad del ensayo a lo largo del intervalo. Es decir, una variación en la concentración del analito entactógeno que es importante debe proporcionar una diferencia de señal medible de manera precisa. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señales y la naturaleza de, y los niveles de punto de corte predeterminados para, los analitos entactógenos determinan normalmente las concentraciones de los diversos reactivos.

45 Aunque el orden de adición puede variar ampliamente, habrá determinadas preferencias que dependen de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más sencillo es añadir 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 pueden combinarse de manera secuencial. Opcionalmente, puede participar una etapa de incubación posteriormente a cada adición, que oscila generalmente entre aproximadamente 30 segundos y aproximadamente 6 horas, más habitualmente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora.

50 Los ejemplos siguientes describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración.

55 En un ensayo homogéneo una vez combinados todos los reactivos, se determina la señal y se relaciona con la cantidad de analito de éxtasis en la muestra. Por ejemplo, en un ensayo EMIT para MDA, se combina una muestra que se sospecha que contiene MDA en un medio acuoso o bien simultáneamente o bien secuencialmente con un conjugado de MDA-enzima y un anticuerpo que puede reconocer MDA y el conjugado, preparándose ambos según la presente invención. En general, se añade un sustrato para la enzima, lo que da como resultado la formación de un producto cromogénico o fluorogénico en la reacción catalizada por enzimas. Las enzimas preferidas son glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina pero pueden emplearse otras enzimas. La MDA y el conjugado de MDA-enzima compiten por sitios de unión en el anticuerpo. Entonces se determina la actividad enzimática en el medio, habitualmente por medios espectrofotométricos, y se compara con la actividad enzimática determinada cuando se someten a prueba calibradores o muestras de referencia en los que está presente una cantidad conocida de MDA. Normalmente, los calibradores se someten a prueba de manera similar a las pruebas de la muestra que se sospecha que contiene MDA. Los calibradores contendrán normalmente concentraciones que difieren, pero se conocen, del analito de MDA que va a determinarse. Preferiblemente, los intervalos de concentración presentes en los

calibradores abarcarán el intervalo de concentraciones de MDA sospechada en las muestras desconocidas.

Ensayos heterogéneos habitualmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se da a conocer una variedad de formatos de ensayo competitivo y no competitivo en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, de la columna 14, línea 25 a la columna 15, línea 9. En un ensayo competitivo típico se pone en contacto un soporte que tiene un anticuerpo para un analito de éxtasis tal como, por ejemplo, un anticuerpo para MDA, unido al mismo con un medio que contiene la muestra y un conjugado de MDA-marcador en el que la MDA se conjuga con un marcador detectable tal como una enzima. Tras la separación del soporte y el medio, se determina la actividad de marcador del soporte o del medio mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de MDA en la muestra.

El soporte puede estar compuesto por un material orgánico o inorgánico, sólido o líquido, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de varias formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, pocillo, banda, varilla, placa y similares. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede suspenderse o no en el medio en que se emplea. Ejemplos de soportes que pueden suspenderse son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lípidas o liposomas, gotas 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), nailon, poli(butirato de vinilo), etc.; o bien usados por sí mismos o bien conjuntamente con otros materiales.

La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede llevarse a cabo mediante técnicas bien conocidas, disponibles comúnmente en la bibliografía, tal como se comentó anteriormente. Véanse, por ejemplo, "Immobilized Enzymes," Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978) y Cautrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245:3059 (1970). La superficie del soporte es habitualmente polifuncional o que puede polifuncionalizarse o que puede unirse a un miembro de sbp, o similar, mediante interacciones covalentes o no covalentes específicas o no específicas. Tal unión es indirecta cuando se usan interacciones no covalentes y es directa cuando se emplean interacciones covalentes. Está disponible o puede incorporarse una amplia variedad de grupos funcionales. 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 se conoce bien y se ilustra ampliamente en la bibliografía (véase anteriormente).

La unión del anticuerpo para MDA y MDA da como resultado la formación de un complejo inmunitario que puede detectarse de manera directa o indirecta de numerosas maneras que se conocen bien en la técnica. Los complejos inmunitarios se detectan directamente, por ejemplo, cuando los anticuerpos empleados se conjugan con un marcador. El complejo inmunitario se detecta indirectamente examinando para determinar el efecto de la formación del complejo inmunitario en un medio de ensayo sobre un sistema de producción de señales o empleando un receptor marcado que se une específicamente a un anticuerpo producido empleando uno de los conjugados de hapteno-inmunógeno de la invención.

La activación del sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señales. Para los miembros de un sistema de producción de señales que se activan con luz, se irradia al miembro con luz. Para los miembros de sistemas de producción de señales que están sobre la superficie de una partícula, la adición de una base puede dar como resultado la activación. Se sugerirán otros métodos de activación a los expertos en la técnica en vista de las descripciones en el presente documento. Para algunos sistemas de producción de señales no es necesario un agente para la activación, tal como aquellos sistemas que implican un marcador que es un marcador radioactivo, una enzima, etcétera. Para sistemas enzimáticos, puede ser necesaria la adición de un sustrato y/o un cofactor.

En determinadas realizaciones pueden emplearse primeros y segundos marcadores y pueden comprender un par de marcadores. Estos pares de marcadores pueden ser, por ejemplo, un par de sensibilizador o generador de oxígeno singlete y reactivo quimioluminiscente, un par enzimático en el que un producto de la primera enzima sirve como sustrato para la segunda enzima y un par de donador y aceptor de energía luminiscente, por ejemplo, un donador o aceptor de energía y un compuesto fluorescente. La señal se iniciará habitualmente mediante y/o se detectará como radiación electromagnética y será preferiblemente luminiscencia tal como quimioluminiscencia, fluorescencia, electroluminiscencia o fosforescencia.

El examen para determinar la presencia y la cantidad de la señal incluye además la detección de la señal, que generalmente sólo es 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, fluorómetro, espectrómetro de absorción, luminómetro, quimioluminómetro, actinómetro, instrumento fotográfico y similares. La presencia y la cantidad de la señal detectada se refieren a la presencia y la cantidad del analito entactógeno presente en una muestra por encima del nivel de punto de corte predeterminado. Las temperaturas durante las mediciones oscilan generalmente entre aproximadamente 10° y aproximadamente 70°C, más habitualmente entre aproximadamente 20° y aproximadamente 45°C, más habitualmente entre aproximadamente 20° y aproximadamente 25°C. En un enfoque se forman curvas patrón usando concentraciones conocidas de los analitos que van a

examinarse. Pueden usarse además calibradores y otros controles

La descripción siguiente de determinadas realizaciones a modo de ejemplo de métodos usa el lenguaje "y/o", que significa que el método puede incluir o no cada punto mencionado. Este lenguaje se usa por motivos de 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.

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
- (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- (v) un compuesto según la reivindicación 27

y

(b) examinar dicho medio para determinar 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, indicando la presencia de los mismos la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

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

Una realización es un método para determinar 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:

- (i) dicha muestra,
- (ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- (v) un compuesto según la reivindicación 48

y

(b) examinar dicho medio para determinar 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, indicando la presencia de los mismos la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioximetanfetamina en dicha muestra.

El examen puede comprender la medición de la señal de la enzima, estando relacionada la cantidad de la misma

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

Una realización es un método para determinar 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:

(i) dicha muestra,

(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, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 27 en el que R^2 es H; y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 27 en el que R^2 es metilo; y/o

(v) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 27 en el que R^2 es etilo;

y

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

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

Otra realización es un método para determinar metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina en una muestra que se sospecha que contiene metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar en combinación en un medio:

(i) dicha muestra,

(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, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 21 en el que R^1 es H; y/o un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 21 en el que R^1 es metilo; y/o

(iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 21 en el que R^1 es etilo;

y

(b) examinar dicho medio para determinar 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, indicando la presencia de los mismos la presencia de dicha anfetamina y/o metanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.

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

Kits

15 Otro aspecto se refiere a kits útiles para realizar de manera conveniente un ensayo para la determinación de un analito de éxtasis tal como, por ejemplo, 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y/o 3,4-metilendioxietilanfetamina (MDEA). El kit comprende (a) un anticuerpo producido contra un conjugado de una proteína y un compuesto de fórmula I, fórmula II o fórmula III y (b) reactivos auxiliares para determinar el compuesto. El kit puede comprender adicionalmente un conjugado con marcador del compuesto de fórmula I, fórmula II o fórmula III anterior.

20 Para potenciar la versatilidad de la invención objeto, pueden proporcionarse los reactivos del kit en combinación envasada, en los mismos envases o separados, en forma líquida o liofilizada de modo que la razón de los reactivos proporciona la optimización sustancial del método y el ensayo. Cada reactivo puede estar en envases separados o pueden combinarse diversos reactivos en uno o más envases dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos.

30 El kit puede incluir adicionalmente otros reactivos envasados por separado para llevar a cabo un ensayo tales como miembros de sbp adicionales, reactivos auxiliares tal como un sustrato enzimático auxiliar, etcétera. Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar las concentraciones de los reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que necesitan producirse durante el presente método y para optimar sustancialmente de manera adicional la sensibilidad del ensayo. En circunstancias apropiadas puede proporcionarse uno o más de los reactivos en el kit como un polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo según la presente invención. El kit puede incluir adicionalmente una descripción escrita de un método según la presente invención tal como se describió anteriormente.

40 La descripción siguiente de determinadas realizaciones a modo de ejemplo de kits usa el lenguaje "y/o," que significa que el kit puede contener o no cada punto mencionado. Este lenguaje se usa por motivos de brevedad. En general, un kit incluirá 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.

Una realización particular es un kit que comprende en combinación envasada:

- 45 (i) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o
- (ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- 50 (iv) un compuesto según la reivindicación 47, en el que R1' es H y R2' es H, metilo o etilo o un compuesto según 48 en el que R1' es H, metilo o etilo.

Otra realización de un kit comprende en combinación envasada:

- 55 (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
- 60 (ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 21 ó 27.

Ejemplos

65 Se demuestra adicionalmente la invención mediante los siguientes ejemplos ilustrativos. Las partes y los porcentajes indicados en el presente documento son en peso a menos que se especifique lo contrario. Las temperaturas están en grados centígrados (°C). La cromatografía en capa fina (CCF) analítica fue el método de análisis habitual,

realizada sobre placas con soporte de vidrio de gel de sílice GF Uniplate de Analtech (0,25 mm) usando el disolvente especificado. Se visualizaron las manchas en CCF mediante luz ultravioleta (onda corta y/o larga) y/o vapores de yodo. Se llevó a cabo la cromatografía ultrarrápida en gel de sílice 60 A de Whatman (malla 230-400). Se obtuvieron todos los productos químicos de Sigma, Aldrich, Fluka y Lancaster y se usaron tal como se recibieron. Se registraron de manera rutinaria los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en un espectrómetro Ultrashiel™ -400 (400 MHz) de Bruker. Se notificó el desplazamiento químico en partes por millón (ppm, δ) y se relacionó con tetrametilsilano o con disolvente deuterado como referencia interna. Las abreviaturas de RMN usadas son s (singlete), d (doblete), dd (doble doblete) y m (multiplete). Se obtuvieron los espectros de masas en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad de California en Berkeley, Berkeley, California.

Se determinaron los puntos de fusión en un aparato capilar Hoover y no están corregidos. Se registraron los espectros infrarrojos en un espectrómetro 297IR de Perkin-Elmer. Se realizaron los espectros de absorción UV-visible en un espectrofotómetro de red de diodos HP 8452A. Se realizaron las mediciones de fluorescencia en un espectrofotómetro fluorolog de Spex o un espectrofotómetro 650-40 de Perkin Elmer.

Las siguientes abreviaturas tienen los significados expuestos a continuación:

g - gramos

mg - miligramos

ml - mililitros

μl - microlitros

mmol - milimoles

DMF - dimetilformamida

THF - tetrahidrofurano

RMN - espectroscopia de resonancia magnética nuclear

MHz - megahercio

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

MeOH - metanol

FAB-EM - bombardeo con átomos rápidos - espectrometría de masas

Agua DI - agua desionizada

Ensayo de concentración de proteínas de BCA - Pierce Chemical Comany

TNBS - ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico

KLH - hemocianina de lapa californiana

NHS - éster N-hidroxisuccinimídico

tBoc₂O - dicarbonato de di-terc-butilo

TFA - ácido trifluoroacético

AcCN - acetonitrilo

Boc-AA-14 - ácido N-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etil}-succinámico (ligador de 14 átomos de longitud)

BSA - albúmina sérica bovina

Proteína portadora - proteína que unida a un hapteno hace que el hapteno sea inmunogénico

DA-10 - etilenglicolbis(2-aminoetil) éter (ligador de 10 átomos de longitud)

DCC - N,N,-diciclohexilcarbodiimida

DIPEA - N,N'-diisopropiletilamina

5 DMF - N,N'-dimetilformamida

DSC - carbonato de N,N'-disuccinimidilo

10 DTE - ditioeritritol; 2,3-dihidroxi-butano-1,4-ditol

EMIT - técnica de inmunoensayo enzimático multiplicado

Hapteno - una sustancia que puede reaccionar específicamente con un anticuerpo pero que por sí misma no puede provocar una respuesta inmunitaria

15 G6PDH - glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa

Inmunógeno - una sustancia que pueda provocar una respuesta inmunitaria

20 MDA - metilendioxianfetamina

MEMA - metilendioximetanfetamina; éxtasis

25 MDEA - metilendioxietilanfetamina

PETINIA - Inmunoensayo de inhibición turbidimétrico potenciado con partículas

TEA o Et₃N - trietilamina

30 TFA - ácido trifluoroacético

CCF - cromatografía en capa fina

35 Preparación de anticuerpos

Puede emplearse el siguiente método para preparar anticuerpos policlonales: Se obtiene antisuero que contiene anticuerpos mediante técnicas bien establecidas que implican inmunización de un animal, tal como un conejo, una cobaya o una cabra, con un inmunógeno apropiado y obtención de antisueros de la sangre del animal inmunizado tras un periodo de espera apropiado. Parker, *Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., EE.UU., 1976), Butler, *J. Immunol. Meth.* 7:1-24 (1975); Broughton y Strong, *Clin. Chem.* 22:726-732 (1976); y Playfair, *et al.*, *Br. Med. Bol.* 30:24-31 (1974) proporcionan revisiones del estado de la técnica.

45 Puede emplearse el siguiente procedimiento para preparar anticuerpos monoclonales: Se produjeron anticuerpos monoclonales según las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975. Se encuentran revisiones de técnicas de anticuerpos monoclonales 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). Se inyectan muestras de una preparación de inmunógenos apropiada en un animal tal como un ratón y, tras un tiempo suficiente, se sacrifica el animal y se obtienen células de bazo. Alternativamente, las células de bazo de un animal no inmunizado pueden sensibilizarse al inmunógeno *in vitro*. Los cromosomas de células de bazo que codifican para las secuencias base para las inmunoglobulinas deseadas pueden comprimirse fusionando las células de bazo, generalmente en presencia de un detergente no iónico, por ejemplo, polietilenglicol, con una línea celular de mieloma. Se permite que las células resultantes, que incluyen hibridomas fusionados, crezcan en un medio selectivo, tal como medio HAT, y las células inmortalizadas supervivientes se hacen crecer en tal medio usando condiciones de dilución limitante. Se hacen crecer las células en un envase adecuado, por ejemplo, pocillos de microtitulación, y se examina el sobrenadante para detectar anticuerpos monoclonales que tienen la especificidad deseada.

60 Existen diversas técnicas para potenciar los rendimientos de anticuerpos monoclonales, tales como inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped mamífero, que acepta las células, y recogida del líquido ascítico. Si se acumula una cantidad insuficiente del anticuerpo monoclonal en el líquido ascítico, el anticuerpo se recoge de la sangre del huésped. Alternativamente, las células que producen el anticuerpo deseado pueden hacerse crecer en un dispositivo de cultivo celular de fibra hueca o un dispositivo de frasco centrifugador, ambos de los cuales se conocen bien en la técnica. Existen diversas maneras convencionales para el aislamiento y la purificación de los anticuerpos monoclonales de otras proteínas y otros contaminantes (véase Köhler y Milstein, citado anteriormente).

65

En general, los anticuerpos pueden purificarse mediante técnicas conocidas tales como cromatografía, por ejemplo, cromatografía en DEAE, cromatografía ABx y similares, filtración, etcétera.

Preparación del compuesto (2)

5 A una disolución de 6-metoxipiperonal (1) (4,5 g, 24,98 mmol) en AcOH glacial (30 ml) se le añadió nitroetano (5,5 ml, 76,18 mmol) y acetato de amonio (3,0 g, 38,92 mmol). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción bajo nitrógeno durante 2 horas (baño de aceite, 118°C). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente. Se eliminó la mayor parte de AcOH mediante evaporación rotatoria a presión reducida y se añadió el agua
10 enfriada con hielo (50 ml) a la mezcla. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 80 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (50 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (2/3) como eluyente para dar el producto deseado (2) (2,25 g, rendimiento del 38%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7,97 (s, 2H), 6,65 (s, 1H), 6,63 (s, 1H), 3,92 (s, 3H), 2,45 (s, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 149,7, 146,8, 144,1, 137,5, 134,1, 127,0,
15 111,7, 104,1, 102,6, 57,2, 14,57.

Preparación del compuesto (4)

20 A una disolución de LiAlH₄ (2 g, 52,7 mmol) en dietiléter (40 ml) se le añadió lentamente una disolución de 2 (2,25 g, 9,49 mmol) en dietiléter (20 ml) y tolueno (20 ml). Se sometió a reflujo la mezcla de reacción bajo nitrógeno durante 4 horas y se permitió que se enfriase hasta temperatura ambiente. Se destruyó cuidadosamente el exceso de LiAlH₄ a -20°C añadiendo agua (20 ml) lentamente. Se filtró y se lavó el residuo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se separó la fase acuosa. Se secó la fase orgánica combinada sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar el compuesto intermedio (3) en bruto (1,89 g, 95%) para la siguiente reacción.

25 A una disolución de 3 (1,29 g, 6,16 mmol) en CH₂Cl₂ (35 ml) se le añadió anhídrido trifluoroacético (5 ml, 35,4 mmol), K₂CO₃ (500 mg, 3,62 mmol) y trietilamina (1,8 ml, 12,9 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió agua (20 ml) y se separó la fase orgánica. Se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (4 x 30 ml). Se secó la fase orgánica combinada sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante
30 cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente para dar el producto deseado (4) (849 mg, rendimiento del 45%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,37 (s, 1H), 6,32 (s, 1H), 5,97 (s, 2H), 4,23 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,81 (dd, J=5,9 Hz, 3,8 Hz, 1 H), 2,72 (dd, J=7 Hz, 4,0 Hz, 1H), 1,24 (d, J=6,7 Hz, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 156,7 (q), 149,4, 144,0, 134,6, 131,4, 116 (d), 108,9, 103,8, 101,8, 57,0, 47,7, 42,2,
35 19,8.

Preparación del compuesto (5)

40 A una disolución de 4 (0,849 g, 2,78 mmol) en quinolina (8,0 ml) se le añadió yodotrimetilsilano (0,6 ml, 4,22 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 180°C bajo nitrógeno durante 70 minutos (baño de aceite). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió a una disolución acuosa de HCl al 10% (15 ml) enfriada con hielo. Se extrajo la fase acuosa con dietiléter (4 x 40 ml). Se eliminó el disolvente orgánico combinado mediante evaporación rotatoria. Se disolvió el residuo en MeOH (25 ml) y se agitó durante 1 hora. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (3/7) como eluyente para dar el producto deseado (5) (357 mg, rendimiento del 44%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,58 (dd, J=8,1 Hz, 1H), 6,33 (s, 1H), 6,29 (s, 1H), 5,92 (s, 2H), 4,20 (m, 1H), 2,75 (dd, J=7,0 Hz, 6,3 Hz, 1H), 2,64 (dd, J=7,0 Hz, 7,1 Hz, 1H), 1,21 (d, J=6,7 Hz, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 157,2 (q), 149,4, 140,0, 133,5, 131,7, 116,2 (d), 112,2, 103,0, 101,7, 48,0, 42,0, 19,7.

Preparación del compuesto (6)

50 A una disolución de 5 (357 mg, 1,226 mmol) en THF (15 ml) se le añadió K₂CO₃ (800 mg, 5,8 mmol) y bromoacetato de *terc*-butilo (0,8 ml, 5,41 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 16 horas. Se eliminó el THF mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (1/4) como eluyente para dar el producto deseado (6) (396 mg, rendimiento del 80%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,57 (dd, J=7,8 Hz, 1H), 6,36 (s, 1H), 6,30 (s, 1H), 5,91 (s, 2H), 4,61 (s, 2H), 4,19 (m, 1H), 2,80 (dd, J=5,9 Hz, 5,8 Hz, 1H), 2,63 (dd, J=7,4 Hz, 7,4 Hz, 1H), 1,47 (s, 9H), 1,18 (d, J=6,7 Hz, 3H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 168,4, 156,9 (q), 149,8, 141,9, 134,4, 131,7, 116,2(d), 111,6, 104,2, 101,7, 82,8, 67,3, 47,8, 42,0, 28,4, 19,6.

Preparación del compuesto (7)

60 A una disolución de 6 (396 mg, 0,977 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se le añadió TFA (2 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 0,5 horas. El análisis de CCF de la mezcla mostró que desaparecía el material de partida 6 y se presentaba una nueva mancha en el nivel inicial (gel de sílice, acetato de etilo/hexano=1/4). Se eliminó la mayor parte del CH₂Cl₂ y del TFA mediante evaporación rotatoria. Se puso el
65

residuo a alto vacío para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado, (7) (336 mg, 98%). $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6,42 (s, 2H), 5,90 (s, 2H), 4,74 (s, 2H), 4,13 (m, 1H), 2,70 (m, 2H), 1,15 (d, $J=6,7$ Hz, 3H).

Preparación del compuesto (8)

5 A una disolución de 7 (168 mg, 0,481 mmol) en THF (10 ml) se le añadió DCC (200 mg, 0,97 mmol) y éster NHS (120 mg, 1,04 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó por filtración el precipitado de la reacción. El análisis de CCF de la mezcla mostró que se presentaba una mancha menos polar en comparación con 7. A esta disolución se le añadió diisopropiletilamina (0,5 ml, 2,86 mmol) y clorhidrato de metilditioetilamina (154 mg, 0,964 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2
10 horas. Se evaporó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/1) para dar el producto deseado (8) (173 mg, rendimiento del 79%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7,06 (m, 1H), 6,56 (d, $J=7,4$ Hz, 1H), 6,43 (s, 1H), 6,35 (s, 1H), 5,96 (s, 2H), 4,58 (s, 2H), 4,20 (m, 1H), 3,69 (q, $J=6,12$ Hz, 2H), 2,86 (t, $J=6,3$ Hz, 2H), 2,78 (m, 1H), 2,69 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 1,22 (d, $J=6,6$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 168,7, 157,0 (q), 150,0, 141,3, 135,0, 132,3, 116,2 (d), 111,5, 105,1, 102,0, 69,5, 47,9, 42,2, 38,2, 37,1, 23,5, 19,6.

Preparación del compuesto (9)

20 A una disolución de 8 (117 mg, 0,257 mmol) en MeOH (8,0 ml) y H_2O (0,4 ml) se le añadió K_2CO_3 (250 mg, 1,81 mmol). Se agitó la mezcla de reacción bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis de CCF de la mezcla (gel de sílice, acetato de etilo/hexano=1/1) mostró que se presentaba una mancha más polar como producto y todavía se presentaba el material de partida (8). Se agitó la reacción y se calentó a 50°C bajo nitrógeno durante 6 horas hasta que el material de partida (8) no podía detectarse mediante análisis de CCF. Se evaporaron el MeOH y el agua mediante evaporación rotatoria y se puso el residuo en línea de alto vacío durante 18
25 horas para eliminar trazas de agua. Se disolvió el residuo en 2 ml de MeOH/ CH_2Cl_2 (1/9). Se eliminó por filtración el K_2CO_3 . Se repitió el mismo procedimiento un par de veces hasta que se eliminó todo el K_2CO_3 . Esto dio el dímero (9) (0,1285 mmol). (9): $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6,45 (s, 2H), 5,94 (s, 2H), 4,63 (s, 2H), 3,59 (t, $J=6,6$ Hz, 2H), 3,04 (m, 1H), 2,88 (t, $J=6,6$ Hz, 2H), 2,52 (m, 2H), 1,08 (d, $J=6,2$ Hz, 3H).

Preparación de inmunógeno de MDA-KLH (12)

a) Preparación de bromoacetil-KLH (11)

35 A una disolución de KLH (40 mg) en tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH}=8,0$, 0,1 M, 10 ml) a 4°C (baño de hielo) se le añadió una disolución de éster NHS del ácido bromoacético (20 mg, 0,084 mmol) en DMF (0,8 ml). Se mantuvo el valor de pH al $\text{pH}=8,0$. Se agitó la mezcla de reacción en la cámara frigorífica (4°C) durante 16 horas. Se purificó la mezcla mediante una columna de Sephadex G-25, eluyendo con tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH}=8,00$, 0,1 M). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna mediante UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre
40 bromoacetil-KLH y el hapteno. Se reunieron juntas las fracciones que contenían el producto (32 ml) y se concentraron hasta 8 ml de bromoacetil-KLH (11) mediante un concentrador AMICON para la siguiente reacción.

b) Preparación de inmunógeno de MDA-KLH (12)

45 A una disolución de 9 (80 mg) en MeOH (3 ml) desgasificado (N_2) se le añadió ditioeritritol (DTE) (20 mg, 0,129 mmol) y Et_3N (0,3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 2 horas. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se secó el residuo a alto vacío durante 2 horas a temperatura ambiente para dar el hapteno deseado (10). Se disolvió el hapteno activado (10) en DMF (0,6 ml) para la siguiente
50 reacción.

A una disolución de bromoacetil-KLH (11) (8 ml, $\text{pH}=8,00$) se le añadió lentamente la disolución anterior de hapteno activado (10) a 4°C bajo nitrógeno. Se mantuvo el valor de pH a 8,0. Se agitó la reacción a 4°C (cámara frigorífica) durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción sobre una columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH}=7,0$, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se
55 obtuvo una separación limpia entre inmunógeno de KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían proteína hasta un volumen total de 41 ml. Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (12) tenía una concentración de 1,05 mg/ml con un número de haptenos de 1128, y se usó para la inmunización de ovejas, ratones y conejos para la producción de anticuerpos.

Preparación de inmunógeno de MDA-BSA (14)

a) Preparación de bromoacetil-BSA (13)

65 A una disolución de BSA (40 mg) en tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH}=8,0$, 0,1 M, 6 ml) a 4°C (baño de hielo) se le añadió una disolución de éster NHS del ácido bromoacético (29 mg, 0,122 mmol) en DMF (0,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción en la cámara frigorífica (4°C) durante 16 horas. Se purificó la mezcla mediante una columna

Sephadex G-25, eluyendo con tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH}=8,00$, $0,1$ M). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna mediante UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre bromoacetil-BSA y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían el producto (33 ml) y se concentraron hasta 8 ml de bromoacetil-BSA (13) mediante un concentrador AMICON para la siguiente reacción.

5

b) Preparación de inmunógeno de MDA-BSA (14)

A una disolución de 9 ($0,077$ mmol) en MeOH (3 ml) desgasificado (N_2) se le añadió ditioeritritol (DTE) ($11,9$ mg, $0,0771$ mmol) y Et_3N ($0,155$ ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 2 horas. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se secó el residuo a alto vacío durante 2 horas a temperatura ambiente para dar el hapteno deseado (10). Se disolvió el hapteno activado (10) en DMF ($0,6$ ml) para la siguiente reacción.

10

A una disolución de bromoacetil-BSA (13) (8 ml, $\text{pH}=8,00$) se le añadió lentamente la disolución de hapteno activado (10) anterior a 4°C bajo nitrógeno. Se mantuvo el valor de pH al $\text{pH}=8,0$. Se agitó la reacción a 4°C (cámara frigorífica) durante 16 horas. Se purificó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH}=7,0$, $0,1$ M, 200 ml). Se eluyó la columna con tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ($\text{pH}=7,0$, $0,1$ M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre bromoacetil-BSA y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían proteína hasta un volumen total de $36,4$ ml. Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (14) tenía una concentración de $1,02$ mg/ml con el número de haptenos de 36 , y se usó para la inmunización de ovejas, ratones y conejos para la producción de anticuerpos.

15

20

Preparación del compuesto (16)

25

A una disolución con agitación de 4 ($1,6669$ g, $5,46$ mmol) en THF (20 ml) bajo nitrógeno se le añadió KH (730 mg, $18,20$ mmol, liberado del aceite mineral protector lavando con hexano tres veces). Se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos y se añadieron 18-corona-6 (470 mg) y Mel ($4,15$ ml, $66,5$ mmol) a la mezcla. Se dejó agitar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante $1,5$ horas y se sometió a reflujo a 78°C bajo nitrógeno durante 16 horas. Se eliminó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria y se añadió diclorometano (30 ml) a la mezcla seguido por adición cautelosa de HCl acuoso al 5% (30 ml). Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (3×30 ml) y se lavó la fase orgánica combinada con agua (2×30 ml) y se secó sobre Na_2SO_4 . Se filtró el disolvente orgánico y se evaporó hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano ($1/4$) como eluyente para dar 16 ($1,5814$ g, rendimiento del 90%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : $6,31$ (m, 2H), $5,91$ (s, 2H), $4,72$, $4,17$ (m, 1H), $3,87$ (s, 3H), $2,95$ (s, 3H), $2,78\text{-}2,65$ (m, 2H), $1,20$ (d, $\text{J}=6,9$ Hz, 3H).

30

35

Preparación del compuesto (17)

A una disolución de 16 ($1,19$ g, $3,73$ mmol) en quinolina ($7,2$ ml) se le añadió yodotrimetilsilano ($1,1$ ml, $7,46$ mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 180°C bajo nitrógeno durante 90 minutos (baño de aceite). Se permitió que la reacción se enfriase hasta temperatura ambiente y se vertió en una disolución acuosa de HCl al 50% (25 ml) enfriada con hielo y dietiléter (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con dietiléter (3×50 ml). Se eliminó el disolvente orgánico combinado mediante evaporación rotatoria. Se disolvió el residuo en MeOH (25 ml) y se agitó durante 1 hora. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano ($3/7$) como eluyente para dar el producto deseado (17) (527 mg, rendimiento del 46%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : $6,34$ (m, 2H), $5,94$ (ms, 2H), $4,75$, $4,15$ (m, 1H), $2,94$ (s, 3H), $2,74\text{-}2,63$ (m, 2H), $1,21$ (d, $\text{J}=6,9$ Hz, 3H).

40

45

Preparación del compuesto (18)

A una disolución de 17 (658 mg, $2,16$ mmol) en THF (20 ml) se le añadió K_2CO_3 ($3,2$ g, $21,6$ mmol) y bromoacetato de terc-butilo ($2,6$ ml, $17,28$ mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 16 horas. Se eliminó el THF mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano ($1/3$) como eluyente para dar el producto deseado (18) (774 mg, rendimiento del 85%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : $6,41\text{-}6,31$ (m, 2H), $5,95$ (ms, 2H), $4,77$, $4,20$ (m, 1H), $4,64$ (m, 2H), $2,94$ (sa, 3H), $2,82\text{-}2,63$ (m, 2H), $1,50$ (s, 9H), $1,21$ (d, $\text{J}=6,90$ Hz, 3H).

55

Preparación del compuesto (19)

60

A una disolución de 18 (509 mg, $1,22$ mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml) se le añadió TFA (2 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante $0,5$ horas. El análisis de CCF de la mezcla mostró que el material de partida, 18 , había desaparecido y se presentaba una nueva mancha en el nivel inicial (gel de sílice, acetato de etilo/hexano= $1/3$). Se eliminó la mayor parte del CH_2Cl_2 y TFA mediante evaporación rotatoria. Se puso el residuo a alto vacío para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado, (19) (518 mg, rendimiento del 100%). $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : $6,50\text{-}6,34$ (m, 2H), $5,96$ (s, 2H), $4,80$ (s, 2H), $4,8$, $4,10$ (m, 1H), $3,05$ (sa, 3H), $2,73\text{-}2,70$ (m,

65

2H), 1,22 (d, J=6,8 Hz, 3H).

Preparación del compuesto (20)

5 A una disolución de 19 (268 mg, 0,738 mmol) en THF (10 ml) se le añadió DCC (308 mg, 1,49 mmol) y éster NHS (175 mg, 1,52 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó por filtración el precipitado de la reacción. El análisis de CCF de la mezcla mostró una mancha menos polar en comparación con 19. A esta disolución se le añadió una disolución de diisopropiletilamina (0,772 ml, 4,43 mmol) y clorhidrato de metilditioetilamina (236 mg, 1,478 mmol) en THF (2 ml) y DMF (0,8 ml). Se agitó la reacción a
10 temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporó la mayor parte del THF y la DMF mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/1) para dar el producto deseado (20) (221 mg, rendimiento del 64%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,46-6,29 (m, 2H), 5,98 (s, 2H), 4,80, 4,10 (m, 1H), 4,61 (s, 2H), 3,70 (t, J =6,3 Hz, 2H), 3,10 (s, 3H), 2,86 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,60-2,80 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 1,21 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

Preparación del compuesto (21)

A una disolución de 20 (120 mg, 0,257 mmol) en MeOH (8,0 ml) y H₂O (0,4 ml) se le añadió K₂CO₃ (241 mg, 1,738 mmol). Se agitó la mezcla de reacción bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 18 horas. El análisis de CCF de la mezcla (gel de sílice, acetato de etilo/hexano = 1/1) mostró una mancha de producto más polar en comparación con el material de partida (20). Se evaporaron el MeOH y agua mediante evaporación rotatoria y se puso el residuo en línea de alto vacío para eliminar trazas de agua. Se disolvió el residuo en 2 ml de MeOH/CH₂Cl₂ (1/9). Se eliminó por filtración el K₂CO₃. Se repitió el mismo procedimiento un par de veces hasta que se eliminó todo el K₂CO₃. Esto dio un rendimiento teórico de dímero 21 (0,1285 mmol): ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ: 6,58-6,43 (m, 2H), 5,93 (s, 2H), 4,61 (s, 2H), 3,60 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,86 (t, J 6,6 Hz, 2H), 2,71-2,68 (m, 2H), 2,44 (m, 1H), 2,36 (s, 3H), 1,00 (d, J = 6,12 Hz, 3H).

Preparación de inmunógeno de MDMA-KLH (23)

a) Preparación de bromoacetil-KLH (11)

A una disolución de KLH (40 mg) en tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,0, 0,1 M, 8 ml) a 4°C (baño de hielo) se le añadió una disolución de éster NHS del ácido bromoacético (14,8 mg, 0,0624 mmol) en DMF (0,5 ml). Se mantuvo el pH a 8,0. Se agitó la mezcla de reacción en la cámara frigorífica (4°C) durante 16 horas. Se purificó la mezcla mediante una columna Sephadex G-25, eluyendo con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,00, 0,1 M). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna mediante UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre bromoacetil-KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían el producto y se concentraron hasta 9 ml de bromoacetil-KLH (11) mediante un concentrador AMICON para la siguiente reacción.

b) Preparación de inmunógeno de MDMA-KLH (23)

A una disolución de 21 (0,1285 mmol) en MeOH desgasificado (N₂) (5 ml) se le añadió ditioeritritol (DTE) (20,6 mg, 0,1285 mmol) y Et₃N (0,3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 2 horas. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se secó el residuo a alto vacío durante 2 horas a temperatura ambiente para dar el tiol deseado (22). Se disolvió el hapteno activado (22) en DMF (0,5 ml) para la siguiente reacción.

A una disolución de bromoacetil-KLH (11) (9 ml, pH = 8,00) se le añadió lentamente la disolución anterior de hapteno activado (22) a 4°C bajo nitrógeno. Se mantuvo el pH a 8,0. Se agitó la reacción a 4°C (cámara frigorífica) durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,0, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre inmunógeno de KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían proteína hasta un volumen total de 34 ml. Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (23) tenía una concentración de 2,17 mg/ml con un número de haptenos de 1728 y se usó para la inmunización de ovejas, ratones y conejos para la producción de anticuerpos.

Preparación de bromoacetil-BSA (24)

a) Preparación de bromoacetil-BSA (11)

A una disolución de BSA (120 mg) en tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,0, 0,1 M, 10 ml) a 4°C (baño de hielo) se le añadió una disolución de éster NHS del ácido bromoacético (85,2 mg, 0,359 mmol) en DMF (0,5 ml). Se mantuvo el valor del pH a 8,0. Se agitó la mezcla de reacción en la cámara frigorífica (4°C) durante 16 horas. Se purificó la mezcla mediante una columna Sephadex G-25, eluyendo con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,00, 0,1 M). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna mediante UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre bromoacetil-BSA y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían el producto y se concentraron hasta 10 ml

de bromoacetil-BSA (13) mediante un concentrador AMICON para la siguiente reacción.

b) Preparación de inmunógeno de MDMA-BSA (24)

- 5 A una disolución de 21 (0,4697 mmol) en MeOH desgasificado (N₂) (10 ml) se le añadió ditioeritritol (DTE) (72,6 mg, 0,47 mmol) y Et₃N (1,11 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 3 horas. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se secó el residuo a alto vacío durante 1 hora a temperatura ambiente para dar el tiol deseado (22). Se disolvió el hapteno activado (22) en DMF (1 ml) para la siguiente reacción.
- 10 A una disolución de bromoacetil-BSA (11) (10 ml, pH = 8,00) se le añadió lentamente la disolución anterior de hapteno activado (22) a 4°C bajo nitrógeno. Se mantuvo el pH a 8,0. Se agitó la reacción a 4°C (cámara frigorífica) durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,0, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre inmunógeno de BSA y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían
- 15 proteína hasta un volumen total de 42,5 ml. Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (24) tenía una concentración de 2,64 mg/ml con un número de haptenos de 28.

Preparación del compuesto (25)

- 20 A una disolución de 19 (92,3 mg, 0,254 mmol) en MeOH (8,0 ml) y H₂O (0,4 ml) se le añadió K₂CO₃ (350 mg, 2,54 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. El análisis de CCF de la mezcla (gel de sílice, acetato de etilo/hexano = 1/1) mostró que se presentaba una mancha más polar como producto en comparación con el material de partida (19). Se evaporó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se
- 25 disolvió el residuo en THF (3 ml) y agua (0,5 ml). A esta disolución se le añadió K₂CO₃ (290 mg, 2,10 mmol) y t-Boc₂O (182,1 mg, 0,834 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó el THF mediante evaporación rotatoria y se añadió agua (4,5 ml). Se acidificó la fase acuosa con ácido acético hasta pH = 4,0. Se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (4 x 10 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con agua (10 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando MeOH/CH₂Cl₂ (12/88) como eluyente para dar el producto deseado (25) (50 mg, rendimiento del 54% en dos
- 30 etapas) (25): ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ: 6,44-6,39 (m, 2H), 5,91 (sa, 2H), 4,74 (sa, 2H), 4,28 (m, 1H), 2,79 (sa, 3H), 2,69-2,54 (m, 2H), 1,48-1,39 (m, 9H), 1,29-1,16 (m, 3H).

Preparación del compuesto (26)

- 35 A una disolución de 25 (50 mg, 0,136 mmol) en THF (3 ml) se le añadió DCC (70 mg, 0,339 mmol) y NHS (30 mg, 0,261 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó por filtración el precipitado de la reacción. El análisis de CCF de la mezcla mostró que se presentaba una mancha menos polar en comparación con 25. A esta disolución se le añadió una disolución de diisopropiletilamina (0,2 ml, 1,15 mmol) y
- 40 ácido 2-maleimidodietilaminatrilfluoroacético (88 mg, 0,346 mmol) en THF (1 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se evaporó la mayor parte del THF mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (7/3) para dar el producto deseado (26) (34 mg, rendimiento del 51%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,93 (m, 1H, NH), 6,71 (s, 2H), 6,40 (m, 2H), 5,95 (s, 2H), 4,55 (s, 2H), 4,30 (m, 1H), 3,75 (m, 2H), 3,56 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 2,81 (s, 3H), 2,78-2,52
- 45 (m, 2H), 1,49-1,36 (m, 9H), 1,26-1,10 (m, 3H).

Preparación del compuesto (27)

- 50 A una disolución de 26 (7 mg, 0,0143 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml) se le añadió TFA (0,2 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. El análisis de CCF de la reacción mostró que desaparecía el material de partida (26) y se presentaba una nueva mancha más polar (gel de sílice, acetato de etilo/hexano, = 7/3). Se eliminó la mayor parte del CH₂Cl₂ y TFA mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se secó
- 55 adicionalmente el residuo a alto vacío para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado (27) (7 mg, rendimiento del 97%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,72 (s, 2H), 6,65-6,42 (m, 2H), 5,97 (s, 2H), 4,60 (s, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,40 (m, 1H), 2,77-2,70 (m, 3H), 1,95 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,26-1,22 (m 3H).

Preparación del compuesto (28)

- 60 A una disolución de MDMA (58 mg, 0,2525 mmol) en DMF (8 ml) se le añadió NaH (40 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió bromoacetato de metilo (50 mg) a la mezcla. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Se eliminó la DMF mediante evaporación rotatoria y se
- 65 añadió agua (5 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 30 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (2/3) como eluyente para dar el producto deseado (28) (63 mg, rendimiento del 94%); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,74 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 6,69 (s, 1H), 6,62 (d, J = 7,9 Hz, 1 H), 5,94 (s, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,33 (s, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,43 (s, 3H), 2,33 (m, 1H), 0,95 (d, J=6,5 Hz, 3H).

Preparación del compuesto (29)

A una disolución de 28 (63 mg, 0,2375 mmol) en MeOH (5 ml) y H₂O (0,5 ml) se le añadió NaOH (200 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió HCl (6 N) para mantener el pH a 2,0. Se eliminó la mayor parte del MeOH y H₂O mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando CH₂Cl₂/MeOH (9/1) como eluyente para dar el producto deseado (29) (32 mg, rendimiento del 47%); ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ: 6,81 (m, 3H), 5,95 (s, 2H), 4,09 (m, 2H), 3,66 (m, 1 H), 3,23 (m, 1H), 2,94 (s, 3H), 2,76 (m, 1H), 1,22 (d, J=6,6 Hz, 3H).

Preparación de inmunógeno de MDMA-BSA (31)

A una disolución de 29 (32 mg, 0,1112 mmol) en DMF (0,8 ml) se le añadió EDAC (70 mg, 0,365 mmol) y NHS (63 mg, 0,547 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 16 horas. Se añadió gota a gota el hapteno activado (30) bajo argón a 8 ml de disolución en fosfato de sodio (0,1 M, pH = 8,0) de BSA (60 mg) a 4°C bajo argón. Cambió el valor del pH durante la adición y se usó 0,1 N de disolución acuosa de NaOH para mantener el pH a 8,0. Tras completarse la adición, se permitió que la disolución se agitase a temperatura ambiente durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,0, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre inmunógeno de KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían proteína hasta un volumen total de 30,5 ml. Se midió la concentración de proteína usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (31) tenía una concentración de 1,74 mg/ml y se usó para la inmunización de ratones, conejos y ovejas para la producción de anticuerpos.

Preparación del compuesto (32)

A una disolución de MDEA (50 mg, 0,205 mmol) en DMF (8 ml) se le añadió NaH (50 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió bromoacetato de metilo (64,6 mg) a la mezcla. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas. Se eliminó la DMF mediante evaporación rotatoria y se añadió agua (6 ml). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (4 x 25 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando acetato de etilo/hexano (2/3) como eluyente para dar el producto deseado (32) (30,2 mg, rendimiento del 53%); ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,72 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 6,69 (s, 1 H), 6,61 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 5,93 (s, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,32 (s, 2H), 3,01(m, 1H), 2,91-2,87 (m, 1H), 2,68 (m, 2H), 2,30 (m, 1H), 1,09 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 0,91 (d, J=6,3 Hz, 3H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 173,6, 147,8, 144,8, 134,5, 122,7, 109,9, 108,4, 101,2, 59,2, 52,1, 51,8, 46,2, 40,2, 15,3, 14,2.

Preparación del compuesto (33)

A una disolución de 32 (30,2 mg, 0,108 mmol) en MeOH (6 ml) y H₂O (0,6 ml) se le añadió NaOH (90 mg). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió HCl (6 N) para mantener el pH a 2,0. Se eliminó la mayor parte del MeOH y H₂O mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando CH₂Cl₂/MeOH (85/15) como eluyente para dar el producto deseado (33) (20,3 mg, rendimiento del 62%); ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ: 6,79 (m, 3H), 5,95 (s, 2H), 4,10 (m, 1 H), 3,74 (m, 1 H), 3,36 (m, 3H), 3,13 (m, 1 H), 2,75 (m, 1 H), 1,37 (m, 3H), 1,22 (d, J=6,6 Hz, 3H).

Preparación de inmunógeno de MDEA-BSA (35)

A una disolución de 33 (20,3 mg, 0,0672 mmol) en DMF (0,7 ml) se le añadió EDAC (32,2 mg, 0,168 mmol) y NHS (28 mg, 0,243 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente bajo argón durante 16 horas. Se añadió gota a gota el hapteno activado (34) bajo argón a 8 ml de disolución en fosfato de sodio (0,1 M, pH = 8,0) de BSA (55 mg) a 4°C bajo argón. Cambió el valor del pH durante la adición y se usó 0,1 N de disolución acuosa de NaOH para mantener el pH a 8,0. Tras la adición, se permitió que la disolución se agitase a temperatura ambiente durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,0, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre inmunógeno de KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían proteína hasta un volumen total de 25,3 ml. Se midió la concentración de proteína usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (35) tenía una concentración de 2,11 mg/ml y se usó para la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos.

Preparación del compuesto (40)

A una disolución con agitación de MDA (100 mg, 0,4636 mmol) en THF (15 ml) se le añadió diisopropiletilamina (0,5 ml, 2,87 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 2-mercapto[S-acetil]acético (116 mg, 0,5016 mmol) a la mezcla de reacción bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. El análisis de CCF de la mezcla

mostró una mancha menos polar como producto en comparación con MDA. Se eliminó el disolvente orgánico hasta sequedad mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice) usando acetato de etilo/hexano (1/1) como eluyente para dar el producto deseado (40) (132 mg, rendimiento del 96%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,72 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 6,64 (s, 2H), 6,60 (s, J = 7,8 Hz, 1 H), 6,10 (m, 1H), 5,93 (s, 2H), 4,15 (m, 1 H), 3,52 (d, j = 14,6 Hz, 1 H), 3,42 (d, J = 14,6 Hz, 1H), 2,66 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 1,10 (d, J=6,7 Hz, 3H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 196,4, 167,8, 147,9, 146,5, 131,8, 122,8, 110,2, 108,5, 101,3, 47,00, 42,3, 33,5, 30,6, 20,2.

Preparación de inmunógeno de MDMA-KLH (42)

a) Preparación de bromoacetil-KLH (11)

A una disolución de KLH (20 mg) en tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,0, 0,1 M, 3 ml) a 4°C (baño de hielo) se le añadió una disolución de éster NHS del ácido bromoacético (10 mg, 0,042 mmol) en DMF (0,2 ml). Se agitó la mezcla de reacción en la cámara frigorífica (4°C) durante 16 horas. Se purificó la mezcla mediante una columna Sephadex G-25, eluyendo con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,00, 0,1 M). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna mediante UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre bromoacetil-KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían el producto (25 ml) y se concentraron hasta 8 ml mediante un concentrador AMICON para la siguiente reacción.

b) Preparación de inmunógeno de MDA-SH-KLH (42)

A una disolución de 40 (30,1 mg) en MeOH desgasificado (N₂) (2 ml) y agua (0,1 ml) se le añadió K₂CO₃ (40 mg, 0,29 mmol) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 45 minutos. Se filtró el MeOH y se eliminó mediante evaporación rotatoria para dar el hapteno (41). Se disolvió el hapteno activado (41) en DMF (0,5 ml) para la siguiente reacción.

A una disolución de bromoacetil-KLH (11) (8 ml, pH = 8,00) se le añadió lentamente la disolución anterior de hapteno activado (41) a 4°C bajo nitrógeno. Se mantuvo el pH a 8,0. Se agitó la reacción a 4°C (cámara frigorífica) durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,0, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre inmunógeno de KLH y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían proteína para tener un volumen total de 34,1 ml. Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (42) tenía una concentración de 0,64 mg/ml con un número de haptenos de 1448 y se usó para la inmunización de ovejas, ratones y conejos para la producción de anticuerpos.

Preparación de inmunógeno de MDA-SH-BSA (43)

(a) Preparación de bromoacetil-BSA (13)

A una disolución de BSA (120 mg) en tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,0, 0,1 M, 10 ml) a 4°C (baño de hielo) se le añadió una disolución de éster NHS del ácido bromoacético (85 mg, 0,3586 mmol) en DMF (0,8 ml). Se agitó la mezcla de reacción en la cámara frigorífica (4°C) durante 16 horas. Se purificó la mezcla mediante una columna Sephadex G-25, eluyendo con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 8,00, 0,1 M). Se monitorizaron las fracciones eluidas de la columna mediante UV a 280 nm. Se obtuvo una separación limpia entre bromoacetil-BSA y el hapteno. Se reunieron juntas las fracciones que contienen el producto (46 ml) y se concentraron hasta 12 ml de bromoacetil-BSA (13) mediante un concentrador AMICON para la siguiente reacción.

b) Preparación de BSA-inmunógeno (43)

A una disolución de 40 (82 mg) en MeOH desgasificado (N₂) (3 ml) y agua (0,2 ml) se le añadió K₂CO₃ (100 mg, 0,7246 mmol) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 45 minutos. Se filtró el MeOH y se eliminó mediante evaporación rotatoria dando el hapteno (41). Se disolvió el hapteno activado (41) en DMF (0,5 ml) para la siguiente reacción.

A una disolución de bromoacetil-BSA (13) (12 ml, pH = 8,00) se le añadió lentamente la disolución anterior de hapteno activado (41) a 4°C bajo nitrógeno. Se mantuvo el pH a 8,0. Se agitó la reacción a 4°C (cámara frigorífica) durante 16 horas. Se separó la mezcla de reacción en la columna Sephadex G-25, que se equilibró con tampón NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,0, 0,1 M). El detector UV a 280 nm monitorizó las fracciones eluidas de la columna. Se obtuvo una separación limpia entre bromoacetil-BSA y el hapteno. Se reunieron las fracciones que contenían proteína hasta un volumen total de 45,5 ml. Se midió la concentración de inmunógeno usando el ensayo de concentración de proteínas de BCA. El inmunógeno (43) tenía una concentración de 2,45 mg/ml con un número de haptenos de 38, y se usó para la inmunización de ovejas, ratones y conejos para la producción de anticuerpos.

Preparación de MDA-AA-14-Boc (47)

A una disolución de MDA (100 mg, 0,4636 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió Et₃N (0,6 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se puso el residuo en línea de alto vacío durante 30 minutos. Se disolvió el residuo en AcCN anhidro (1 ml) y se indicó como disolución A para la siguiente reacción.

5 A una disolución de DSC (251 mg, 0,98 mmol) y Boc-AA-14 (250 mg, 0,718 mmol) en AcCN anhidro (5 ml) se le añadió Et₃N (0,28 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2,5 horas y entonces se añadieron a la reacción Et₃N (0,2 ml) y la disolución A. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó la mayor parte del disolvente mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando CH₂Cl₂/MeOH (9/1) como eluyente para dar el producto deseado (47) (230 mg, rendimiento del 97%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,72 (a, NH, 1 H), 6,67 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 6,64 (s, 1 H), 6,57 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,42 (a, NH, 1 H), 5,88 (s, 2H), 5,27 (a, NH, 1 H), 4,09 (m, 1 H), 3,56-3,50 (m, 8H), 3,40 (m, 2H), 3,28 (m, 2H), 2,69 (m, 1H), 2,53 (m, 1 H), 2,50 (m, 4H), 1,40 (s, 9H), 1,05 (d, J=6,6 Hz, 3H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 172,8, 171,8, 156,5, 147,9, 146,4, 132,4, 122,6, 110,1, 108,4, 101,2, 79,6, 70,6, 70,1, 50,8, 46,8, 42,6, 40,7, 39,7, 32,3, 32,1, 28,8, 20,2.

Preparación de MDA-AA-14-NH₂ (48)

20 A una disolución de 47 (230 mg, 0,4516 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se le añadió TFA (0,5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El análisis de CCF de la reacción mostró que desaparecía el material de partida (47) y se presentaba una nueva mancha más polar (gel de sílice, MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9). Se eliminó la mayor parte del CH₂Cl₂ y TFA mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se secó adicionalmente el residuo a alto vacío durante 18 horas para eliminar trazas de TFA. Se disolvió el residuo en MeOH (5 ml) y se añadió NH₄OH para ajustar el valor del pH a 10. Se evaporaron el MeOH y el exceso de NH₄OH a presión reducida. 25 Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando CH₂Cl₂/MeOH (8/2) como eluyente para dar el producto deseado (48) (126 mg, rendimiento del 68%). ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ: 6,61 (m, 2H), 6,54 (m, 1H), 5,78 (s, 2H), 3,96 (m, 1 H), 3,62-3,53 (m, 6H), 3,45 (m, 2H), 3,28 (m, 2H), 3,01 (m, 2H), 2,58 (m, 1H), 2,49 (m, 1 H), 2,37 (m, 4H), 0,99 (d, J=6,6 Hz, 3H).

Preparación de MDMA-AA-14-Boc (50)

30 A una disolución de MDMA (50 mg, 0,2176 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió Et₃N (0,3 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se puso el residuo en línea de alto vacío durante 30 minutos. Se disolvió el residuo en AcCN anhidro (1 ml) y se indicó como disolución A para la siguiente reacción.

35 A una disolución de DSC (78 mg, 0,3046 mmol) y Boc-AA-14 (78 mg, 0,2176 mmol) en AcCN anhidro (2 ml) se le añadió Et₃N (0,076 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2,5 horas y entonces se añadieron a la reacción Et₃N (0,076 ml) y la disolución A. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó la mayor parte del disolvente mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando CH₂Cl₂/MeOH (9/1) como eluyente para dar el producto deseado (50) (49 mg, rendimiento del 43%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7,02 (a, NH, 1H), 6,73-6,56 (m, 3H), 5,93-5,92 (sa, 2H), 5,27 (a, NH, 1 H), 4,80, 4,15 (m, 1H), 3,61-3,54 (m, 8H), 3,42-3,32 (m, 5H), 2,84, 2,81 (s, 3H), 2,60-2,45 (m, 5H), 1,43 (s, 9H), 1,23 (d, J =6,3 Hz), 1,01 (d, J =6,5 Hz, 3H).

Preparación de MDMA-AA-14-NH₂ (51)

40 A una disolución de 50 (49 mg, 0,0936 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se le añadió TFA (0,4 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El análisis de CCF de la reacción mostró que desaparecía el material de partida (50) y se presentaba una nueva mancha más polar (gel de sílice, MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9). Se eliminó la mayor parte del CH₂Cl₂ y TFA mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se secó adicionalmente el residuo a alto vacío durante 18 horas para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado (51) (46 mg, rendimiento del 91,4%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,74-6,69 (m, 1 H), 6,61-6,55 (m, 2H), 5,93-5,91 (sa, 2H), 4,80, 4,15 (m, 1 H), 3,61-3,54 (m, 8H), 3,42-3,32 (m, 5H), 2,84, 2,81 (s, 3H), 2,60-2,45 (m, 5H), 1,24 (d, J = 6,6 Hz, 1,5H), 1,09 (d, J =6,8 Hz, 1,5H).

Preparación de MDEA-AA-14-Boc (53)

45 A una disolución de MDEA (100 mg, 0,41 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió Et₃N (0,6 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se eliminó el MeOH mediante evaporación rotatoria y se puso el residuo en línea de alto vacío durante 30 minutos. Se disolvió el residuo en AcCN anhidro (1 ml) y se indicó como disolución A para la siguiente reacción.

60 A una disolución de DSC (250 mg, 0,976 mmol) y Boc-AA-14 (250 mg, 0,718 mmol) en AcCN anhidro (2 ml) se le añadió Et₃N (0,28 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2,5 horas y entonces se

65

añadieron a la reacción Et₃N (0,2 ml) y la disolución A. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se eliminó la mayor parte del disolvente mediante evaporación rotatoria. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida usando CH₂Cl₂/MeOH (9/1) como eluyente para dar el producto deseado (53) (41 mg, rendimiento del 19%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,73-6,60 (m, 3H), 6,55 (a, NH, 1H), 5,93-5,90 (sa, 2H), 5,25 (a, NH, 1H), 4,40, 4,15 (m, 1 H), 3,66-3,29 (m, 12H), 2,67-2,33 (m, 6H), 1,42 (s, 9H), 1,23-1,12(m, 6H).

Preparación de MDEA-AA-14-NH₂ (54)

A una disolución de 53 (41 mg, 0,07625 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml) se le añadió TFA (0,2 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El análisis de CCF de la reacción mostró que desaparecía el material de partida (53) y se presentaba una nueva mancha más polar (gel de sílice, MeOH/CH₂Cl₂ = 1/9). Se eliminó la mayor parte del CH₂Cl₂ y TFA mediante evaporación rotatoria a presión reducida. Se secó adicionalmente el residuo a alto vacío durante 18 horas para eliminar trazas de TFA. Esto dio el producto deseado (54) (40 mg, rendimiento del 95%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 6,74-6,70 (m, 1H), 6,60-6,55 (m, 2H), 5,93-5,90 (sa, 2H), 4,30, 4,06 (m, 1H), 3,76-3,21 (m, 12H), 2,81-2,51 (m, 6H), 1,23-1,12 (m, 6H).

Preparación de reactivos de partículas de MDA, MDMA y MDEA

Acoplamiento directo de MDA, MDMA y MDEA a PRM

a) Partícula de látex de MDA (44)

Se preparan reactivos de partículas de MDA de diversos niveles de inmovilización mediante adición gota a gota y secuencial de GAFAC (0,507-0,529 ml, disolución madre al 14,7%, al 0,7% en la reacción), MDA (0,139-0,580 ml, disolución madre 77,27 mM; 1, 2, 3 y 4 mM en la reacción) y DA-10 (0,099-0,104 ml, disolución madre 324,4 mM, 3 mM en la reacción) en material de partida de partículas (PRM) diafiltradas (10 ml, disolución madre al 10,3%, el 9,62-9,24% de sólidos en la reacción). Se mide el pH y se ajusta a 9,2. Se llevan a cabo las reacciones a 70°C durante 18 horas. Se separa cada sobrenadante (10 ml) mediante centrifugación (28.000 rpm) y decantación. Se añade tampón de lavado nuevo (20 ml, GAFAC al 1,0%, tampón fosfato 15 mM, Proclin al 0,2%, sulfato de neomicina al 0,006%) a cada tubo de reacción y se resuspenden los reactivos de partículas mediante sonicación. Se repite este procedimiento de intercambio de sobrenadante 3 veces más. Se resuspenden los sedimentos finales en tampón de lavado (20 ml) dando como resultado disoluciones de concentrado de partículas (20 ml, 50 mg/ml).

b) Partícula de látex de MDMA (45)

Se preparan reactivos de partículas de MDMA de diversos niveles de inmovilización mediante adición gota a gota y secuencial de GAFAC (0,48-0,502 ml, disolución madre al 14,7%, al 0,7% en la reacción), MDMA (0,148-0,620 ml, disolución madre 72,56 mM; 1, 2, 3 y 4 mM en la reacción) y DA-10 (0,122-0,128 ml, disolución madre 324,4 mM, 3 mM en la reacción) en material de partida de partículas diafiltradas (10 ml, disolución madre al 10,3%, el 9,62-9,24% de sólidos en la reacción). Se mide el pH y se ajusta a 9,2. Se llevan a cabo las reacciones a 70°C durante 18 horas. Se separa cada sobrenadante (10 ml) mediante centrifugación (28.000 rpm) y decantación. Se añade tampón de lavado nuevo (20 ml, GAFAC al 1,0%, tampón fosfato 15 mM, Proclin al 0,2%, sulfato de neomicina al 0,006%) a cada tubo de reacción y se resuspenden los reactivos de partículas mediante sonicación. Se repite este procedimiento de intercambio de sobrenadante 3 veces más. Se resuspenden los sedimentos finales en tampón de lavado (20 ml) dando como resultado disoluciones de concentrado de partículas (20 ml, 50 mg/ml).

c) Partícula de látex de MDEA (46)

Se prepararon reactivos de partículas de MDEA de diversos niveles de inmovilización mediante adición gota a gota y secuencial de GAFAC (0,508-0,533 ml, disolución madre al 14,7%, al 0,7% en la reacción), MDEA (0,157-0,661 ml, disolución madre 68,4 mM; 1, 2, 3 y 4 mM en la reacción) y DA-10 (0,100-0,104 ml, disolución madre 324,4 mM, 3 mM en la reacción) en material de partida de partículas diafiltradas (10 ml, disolución madre al 10,3%, el 9,62-9,24% de sólidos en la reacción). Se mide el pH y se ajusta a 9,2. Se llevan a cabo las reacciones a 70°C durante 18 horas. Se separa cada sobrenadante (10 ml) mediante centrifugación (28.000 rpm) y decantación. Se añade tampón de lavado nuevo (20 ml, GAFAC al 1,0%, tampón fosfato 15 mM, Proclin al 0,2%, sulfato de neomicina al 0,006%) a cada tubo de reacción y se resuspenden los reactivos de partículas mediante sonicación. Se repite este procedimiento de intercambio de sobrenadante 3 veces más. Se resuspenden los sedimentos finales en tampón de lavado (20 ml) dando como resultado disoluciones de concentrado de partículas (20 ml, 50 mg/ml).

Acoplamiento de MDA, MDMA y MDEA con ligador a PRM

a) Partícula de látex de MDA-AA-14-NH₂ (49)

Se preparan reactivos de partículas de MDA-AA-14-NH₂ de diversos niveles de inmovilización mediante adición gota a gota y secuencial de GAFAC (0,507-0,527 ml, disolución madre al 14,7%, al 0,7% en la reacción), MDA-AA-14-NH₂ (0,132-0,549 ml, disolución madre 81,4 mM; 1, 2, 3, y 4 mM en la reacción) y DA-10 (0,099-0,103 ml, disolución

madre 324,4 mM, 3 mM en la reacción) en material de partida de partículas diafiltradas (10 ml, disolución madre al 10,3%, el 9,62-9,24% de sólidos en la reacción). Se mide el valor del pH y se ajusta a 9,2. Se llevan a cabo las reacciones a 70°C durante 18 horas. Se separa cada sobrenadante (10 ml) mediante centrifugación (28.000 rpm) y decantación. Se añade tampón de lavado nuevo (20 ml, GAFAC al 1,0%, tampón fosfato 15 mM, Proclin al 0,2%, sulfato de neomicina al 0,006%) a cada tubo de reacción y se resuspenden los reactivos de partículas mediante sonicación. Se repite este procedimiento de intercambio de sobrenadante 3 veces más. Se resuspenden los sedimentos finales en tampón de lavado (20 ml) dando como resultado disoluciones de concentrado de partículas (20 ml, 50 mg/ml).

10 b) Partícula de látex de MDMA-AA-14-NH₂ (52)

Se preparan reactivos de partículas de MDMA-AA-14-NH₂ de diversos niveles de inmovilización mediante adición gota a gota y secuencial de GAFAC (0,505-0,520 ml, disolución madre al 14,7%, al 0,7% en la reacción), MDA-AA-14-NH₂ (0,096-0,396 ml, disolución madre 111,6 mM; 1, 2, 3 y 4 mM en la reacción) y DA-10 (0,122-0,125 ml, disolución madre 264,0 mM, 3 mM en la reacción) en material de partida de partículas diafiltradas (10 ml, disolución madre al 10,3%, el 9,62-9,24% de sólidos en la reacción). Se mide el pH y se ajusta a 9,2. Se llevan a cabo las reacciones a 70°C durante 18 horas. Se separa cada sobrenadante (10 ml) mediante centrifugación (28.000 rpm) y decantación. Se añade tampón de lavado nuevo (20 ml, GAFAC al 1,0%, tampón fosfato 15 mM, Proclin al 0,2%, sulfato de neomicina al 0,006%) a cada tubo de reacción y se resuspenden los reactivos de partículas mediante sonicación. Se repite este procedimiento de intercambio de sobrenadante 3 veces más. Se resuspenden los sedimentos finales en tampón de lavado (20 ml) dando como resultado disoluciones de concentrado de partículas (20 ml, 50 mg/ml).

25 c) Partícula de látex de MDEA-AA-14-NH₂ (55)

Se preparan reactivos de partículas de MDEA-AA-14-NH₂ de dos niveles de inmovilización mediante adición gota a gota y secuencial de GAFAC (0,515 y 0,531 ml, disolución madre al 14,7%, al 0,7% en la reacción), MDEA-AA-14-NH₂ (0,301 y 0,621 ml, disolución madre 72,53 mM; 2 y 4 mM en la reacción) y DA-10 (0,101 y 0,104 ml, disolución madre 324,4 mM, 3 mM en la reacción) en material de partida de partículas diafiltradas (10 ml, disolución madre al 10,3%, el 9,62-9,24% de sólidos en la reacción). Se mide el pH y se ajusta a 9,2. Se llevan a cabo las reacciones a 70°C durante 18 horas. Se separa cada sobrenadante (10 ml) mediante centrifugación (28.000 rpm) y decantación. Se añade tampón de lavado nuevo (20 ml, GAFAC al 1,0%, tampón fosfato 15 mM, Proclin al 0,2%, sulfato de neomicina al 0,006%) a cada tubo de reacción y se resuspenden los reactivos de partículas mediante sonicación. Se repite este procedimiento de intercambio de sobrenadante 3 veces más. Se resuspenden los sedimentos finales en tampón de lavado (20 ml) dando como resultado disoluciones de concentrado de partículas (20 ml, 50 mg/ml).

Pueden emplearse los anticuerpos y conjugados de partículas en ensayos para la detección de los analitos respectivos.

40 Preparación de bromoacetil-G6PDH

Haciendo referencia a la figura 9, se incubó una mezcla de 2,1 ml de G6PDH, (11,8 mg/ml) que contenía 24,78 mg de proteína, en fosfato 100 mM-EDTA 1,0 mM, pH 7,44 y 0,32 ml de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético (5 mg/ml) en DMF a temperatura ambiente durante 3 horas. Se intercambió el tampón de la mezcla de proteína por fosfato 100 mM-EDTA 5,0 mM, pH 6,0 en un sistema de ultrafiltración de Amicon equipado con una membrana YM10. Se continuó el intercambio de tampón para concentrar hasta 3 ml. Esto proporcionó bromoacetil-G6PDH (21,6 mg, 7,2 mg/ml).

50 3) Preparación de conjugado de G6PDH a partir de los compuestos (9) y (40)

Haciendo referencia a la figura 10, se disolvió una mezcla de dímero (9) (29,5 mg, 0,0474 mmol) en metanol (6 ml). A esta disolución con agitación se le añadió una disolución de 7,7 mg de DTE en metanol (1 ml) y trietilamina (10 µl) bajo nitrógeno. Se agitó esta mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporó el metanol y se puso a vacío durante 1 hora. A este compuesto se le añadió bromoacetil-G6PDH (preparado tal como se describió anteriormente) (1,4 ml, 7,2 mg/ml, 10,08 mg de proteína) y 0,6 ml de fosfato 100 mM-EDTA 5,0 mM, pH 7,60. Se ajustó el pH desde 7,32 hasta 7,72. Se agitó la mezcla a 4°C durante 18 horas. Se diluyó la mezcla con fosfato 50 mM y NaCl 100 mM, pH = 7,0. Se intercambió el tampón de la mezcla de proteína por fosfato 50 mM y NaCl 100 mM, pH 7,0 en un sistema de ultrafiltración de Amicon equipado con una membrana YM10 hasta que se observó reacción negativa de DTDP. Esto dio 3 ml de conjugado de G6PDH (1,68 mg/ml, 5,04 mg de proteína).

Haciendo referencia a la figura 11, a una disolución de 40 (16,7 mg, 0,0565 mmol) en metanol (1 ml) se le añadió K₂CO₃ (20 mg) y agua (50 µl) bajo nitrógeno. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se evaporó el metanol hasta sequedad y se disolvió el compuesto en DMF (0,2 ml). A esta disolución se le añadió bromoacetil-G6PDH (preparado tal como se describió anteriormente) (1,5 ml, 7,2 mg/ml, 10,8 mg de proteína) y 0,62 ml de fosfato 100 mM-EDTA 5,0 mM, pH 7,60. Se ajustó el pH desde 7,41 hasta 7,70. Se agitó la mezcla a 4°C durante 16 horas. Se centrifugó la mezcla y se filtró. Se diluyó la disolución con fosfato 50 mM y NaCl

100 mM, pH = 7,0. Se intercambió el tampón de la mezcla de proteína por fosfato 50 mM-NaCl 100 mM, pH 7,0 en un sistema de ultrafiltración de Amicon equipado con una membrana YM10 hasta que se observó reacción negativa de DTDP. Esto dio 3 ml de conjugado de G6PDH (3,34 mg/ml, 10 mg de proteína).

- 5 También se preparó un conjugado de compuesto (22) y G6PDH mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente.

Ensayo usando reactivos según las realizaciones de la presente invención

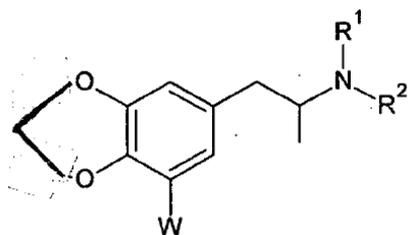
10 Pueden emplearse los anticuerpos y conjugados enzimáticos según la invención en ensayos para la detección de los respectivos analitos. Se inyecta el inmunógeno en ovejas para generar anticuerpos. Se añade de manera conocida el anticuerpo obtenido a partir del sangrado de ovejas en el diluyente de anticuerpos para preparar el reactivo de anticuerpos. El reactivo de anticuerpos consiste en anticuerpo tal como se preparó anteriormente, tampón, estabilizadores, conservantes y los sustratos para el conjugado enzimático NAD y glucosa 6 fosfato.

15 Se añade de manera conocida conjugado enzimático a partir de un compuesto de la invención en el reactivo de conjugado para preparar el reactivo de conjugado enzimático. El reactivo de conjugado enzimático consiste en el conjugado, tampón, estabilizadores y conservantes.

20 Se usan el reactivo de anticuerpos y el reactivo de conjugado enzimático en un formato de ensayo homogéneo para detectar éxtasis en muestras de orina. El analizador (instrumento) usado para establecer el ensayo es el analizador bioquímico Syva 30-R (Syva Company, Cupertino CA). Se incuba la muestra de orina que contiene éxtasis con reactivo de anticuerpos seguido por la adición del reactivo de conjugado enzimático. La actividad del conjugado enzimático disminuye tras la unión al anticuerpo. El conjugado enzimático, que no está unido al anticuerpo, cataliza la oxidación de glucosa 6-fosfato (G6P). La oxidación de G6P está acoplada con la reducción de NAD⁺ a NADH, que puede medirse a 340 nm. Puede medirse el cambio en la absorbancia a 340 nm espectrofotométricamente. Puede medirse la concentración de éxtasis en una muestra de orina en cuanto a actividad de G6PDH. El aumento en la velocidad a 340 nm se debe a la formación de NADH y es proporcional a la actividad del conjugado enzimático. Se genera una curva de ensayo usando MDMA añadida de manera conocida en orina negativa. La velocidad de ensayo aumenta con el aumento de la concentración de droga libre en la muestra. Aunque se ha descrito la invención precedente en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de comprensión, resultará evidente para los expertos habituales en la técnica en vista de las enseñanzas de esta invención que pueden hacerse determinados cambios y modificaciones. Además, la descripción precedente, para fines de explicación, usó nomenclatura específica para proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, resultará evidente para un experto en la técnica que los detalles específicos no se requieren con el fin de poner en práctica la invención. Por tanto, las descripciones precedentes de realizaciones específicas de la presente invención se presentan para fines de ilustración y descripción. Son posibles muchas modificaciones y variaciones en vista de las enseñanzas anteriores. Se escogieron y se describieron las realizaciones con el fin de explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y para permitir de ese modo a otros expertos en la técnica utilizar la invención.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula I :



Fórmula I

en la que:

R¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

R² es

(a) $-(CH_2)_aC(O)(CH_2)_bSR^3$, en la que

a es de 0 a 5,

b es de 1 a 5 y

R³ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono o $(CH_2)_cC(O)NR^4R^5$ en la que

R⁴ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y

R⁵ es H, un portador inmunogénico o un marcador, o

$-(CH_2)_cC(O)DR^6$, en la que

c es de 2 a 6,

D es O, S o NR⁷, en la que

R⁷ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono, y

R⁶ es H, un portador inmunogénico o un marcador; o

(b) $(A)_d(Q)_n$ en la que

Q es H o $-(CH_2)_eCH(R^8)(CH_2)_fC(O)(CH_2)_gR^9$, siendo H sólo cuando d es 1 en la que

A es $-C(O)(CH_2)_hC(O)NR^{10}((CH_2)_jO(CH_2)_kO)_m(CH_2)NR^{11}-$,

d es 0 ó 1,

n es 0 ó 1 en la que uno de los d o n es 1,

h es de 1 a 5,

R¹⁰ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

j es de 1 a 5,

k es de 1 a 5,

m es de 1 a 3,

R¹¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

- e es de 1 a 5,
 R^8 es OH o H,
 5 f es de 1 a 5,
 g es de 0 a 5, y
 10 R^9 es H, un portador inmunogénico o un marcador;
 W es H,
 y que incluye las sales de ácido del mismo.
- 15 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que
 R^1 es H y
 R^2 es H.
- 20 3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que
 R^1 es H y
 25 R^2 es alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono.
4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que
 R^{16} es $-(CH_2)_qC(O)NR^{17}R^{18}$ y
 30 R^{18} es un poli(aminoácido).
5. Compuesto según la reivindicación 1, en el que
 35 R^1 es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,
 W es H y
 R^2 es $-(CH_2)_aC(O)(CH_2)_bSR^3$, en la que
 40 R^3 es $-(CH_2)_cC(O)NR^4R^5$ en la que
 R^4 es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y
 45 R^5 es un poli(aminoácido).
6. Compuesto según la reivindicación 1, en el que
 50 R^1 es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,
 W es H y
 R^2 es $-(CH_2)_aC(O)(CH_2)_bSR^3$, en la que
 55 R^3 es $-(CH_2)_cC(O)NR^4R^5$ en la que
 R^4 es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y
 60 R^5 es un portador inmunogénico.
7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que
 65 R^1 es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,
 W es H y

R² es (A)_d(Q)_n en la que

d es 0,

5 n es 1,

Q es -(CH₂)_eCH(R⁸)(CH₂)_fOC(O)(CH₂)_gR⁹ y

R⁹ es un poli(amino)ácido.

10 8. Compuesto según la reivindicación 1, en el que

R¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

15 W es H y

R² es (A)_d(Q)_n en la que

d es 1,

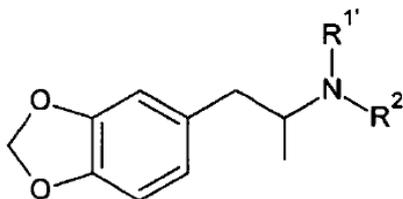
20 n es 1,

Q es -(CH₂)_eCH(R⁸)(CH₂)_fC(O)(CH₂)_gR⁹ y

25 A es -C(O)(CH₂)_hC(O)NR¹⁰((CH₂)_jO(CH₂)_kO)_m(CH₂)NR¹¹⁻, y

R⁹ es un poli(amino)ácido.

30 9. Compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula II:



Fórmula II

en la que:

35 R^{1'} es H, alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector,

R^{2'} es

40 (a) -(CH₂)_aC(O)(CH₂)_bSR^{3'}, en la que

a es de 0 a 5,

b es de 1 a 5 y

45 R^{3'} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono o (CH₂)_cC(O)NR^{4'}R^{5'},

en la que

50 R^{4'} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y

R^{5'} es H, un portador inmunogénico o un marcador, o

55 (b) (A)_d(Q)_n en la que

Q es H o -(CH₂)_eCH(R⁸)(CH₂)_fC(O)(CH₂)_gR⁹ siendo H sólo cuando d es 1 en la que

A es -C(O)(CH₂)_hC(O)NR¹⁰((CH₂)_jO(CH₂)_kO)_m(CH₂)NR¹¹⁻,

d es 0 ó 1,

n es 0 ó 1 en la que uno de los d o n es 1,

h es de 1 a 5,

R¹⁰ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

j es de 1 a 5,

k es de 1 a 5,

m es de 1 a 3,

R¹¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

e es de 1 a 5,

R⁸ es OH o H,

f es de 1 a 5,

g es de 0 a 5, y

R⁹ es H, un portador inmunogénico o un marcador,

y que incluye las sales de ácido del mismo.

10. Compuesto según la reivindicación 9, en el que

R¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y

R² es $-(\text{CH}_2)_a\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_b\text{SR}^3$ en la que

a es 0,

b es 1,

R³ es H.

11. Compuesto según la reivindicación 9, en el que

R¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y

R² es $-(\text{CH}_2)_a\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_b\text{SR}^3$ en la que

a es 0,

b es 1,

R³ es $-(\text{CH}_2)_c\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$ en la que

c es 1,

R⁴ es H y

R⁵ es un poli(amino)ácido.

12. Compuesto según la reivindicación 11, en el que dicho poli(amino)ácido es una enzima o un inmunógeno.

13. Compuesto según la reivindicación 9, en el que

R¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y

R² es $-(\text{CH}_2)_a\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_b\text{SR}^3$ en la que

- 5
 a es 0,
 b es 1,
 R^3 es $(CH_2)_cC(O)NR^4R^5$ en la que
 c es 1,
 10 R^4 es H y
 R^5 es un portador inmunogénico.
14. 15 Compuesto según la reivindicación 9, en el que
 R^1 es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y
 R^2 es $-(CH_2)_aC(O)(CH_2)_bSR^3$ en la que
 20 a es 0,
 b es 1,
 R^3 es $(CH_2)_cC(O)NR^4R^5$ en la que
 25 c es 1,
 R^4 es H y
 R^5 es una partícula.
 30
15. 35 Compuesto según la reivindicación 9, en el que
 R^1 es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y
 R^2 es $(A)_d(Q)_n$ en la que
 40 d es 0,
 n es 1,
 Q es $-(CH_2)_eCH(R^8)(CH_2)_fOC(O)(CH_2)_gR^9$,
 45 e es 1,
 R^8 es OH,
 f es 1,
 50 g es 0 y
 R^9 es un poli(amino)ácido.
16. 55 Compuesto según la reivindicación 9, en el que
 R^1 es H, metilo o etilo y
 R^2 es $(A)_d(Q)_n$ en la que
 60 d es 1,
 n es 1,
 A es $-C(O)(CH_2)_hC(O)NR^{10}O((CH_2)_jO(CH_2)_kO)_m(CH_2)_2NR^{11}-$
 65 h es 2

R¹⁰ es H

j es 2

k es 2

m es 1

R¹¹ es H,

Q es $-(\text{CH}_2)_e\text{CH}(\text{R}^8)(\text{CH}_2)_f\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_g\text{R}^9$,

e es 1,

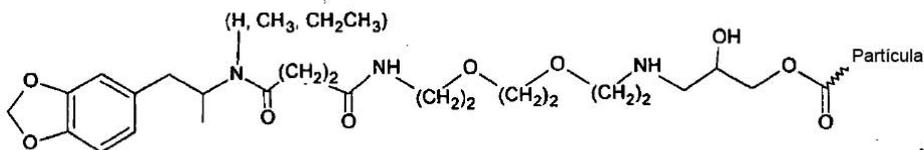
R⁸ es OH,

f es 1,

g es 0 y

R⁹ es una partícula,

teniendo el compuesto la fórmula



17. Compuesto según la reivindicación 15, en el que dicho poli(amino)ácido es una enzima o un inmunógeno.

18. Compuesto según la reivindicación 9, en el que

R¹ es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono y

R² es (A)_d(Q)_n en la que

d es 1,

n es 1,

Q es $-(\text{CH}_2)_e\text{CH}(\text{R}^8)(\text{CH}_2)_f\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_g\text{R}^9$,

e es 1,

R⁸ es OH,

f es 1,

g es 0,

A es $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_h\text{C}(\text{O})\text{NR}^{10}/((\text{CH}_2)_j\text{O}(\text{CH}_2)_k\text{O})_m(\text{CH}_2)\text{NR}^{11}-$,

h es 2,

m es 1,

j es 2,

k es 2,

R^{10'} es H

R¹¹ es H y

5 R^{9'} es un poli(amino)ácido o una partícula.

19. Compuesto según la reivindicación 18, en el que

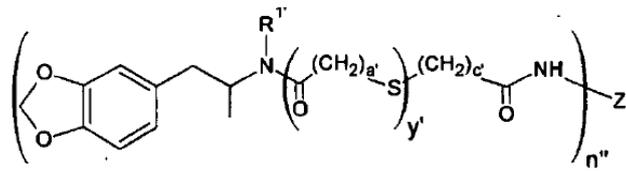
R^{9'} es un poli(amino)ácido, que es una enzima o un inmunógeno.

10

20. Compuesto según la reivindicación 18, en el que

R^{9'} es una partícula.

15 21. Compuesto según la reivindicación 9 que tiene la fórmula:



en la que:

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

a' es de 1 a 5,

y' es 1,

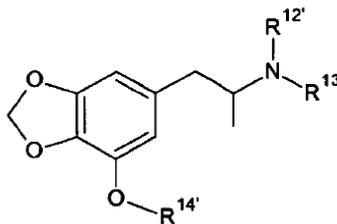
25

Z'' es un proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(aminoácido),

c' es de 1 a 5,

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

22. Compuesto de fórmula III:



35

Fórmula III

en la que:

40 R^{12'} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

R^{13'} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

45

R^{14'} es un grupo protector o -(CH₂)_rC(O)NR^{15'}(CH₂)_s(D)_tR^{16'}, en la que

r es de 1 a 5,

R^{15'} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

50

s es de 1 a 5,

D es S, O o N,

t es 0 ó 1 siendo 0 cuando R^{16} es maleimidilo o succinimidilo,

R^{16} es H, un grupo protector, maleimidilo o succinimidilo, o $-(CH_2)_qC(O)NR^{17}R^{18}$, en la que

q es de 1 a 5

R^{17} es H, alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector,

R^{18} es H, alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono, un grupo protector, un portador inmunogénico o marcador,

y que incluye sales del mismo.

23. Compuesto según la reivindicación 22, en el que

R^{12} es H y

R^{13} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

R^{14} es $-(CH_2)_rC(O)NR^{15}(CH_2)_s(D)_tR^{16}$, en la que

r es 1,

R^{15} es H,

s es 2,

D es S,

t es 1 y

R^{16} es H.

24. Compuesto según la reivindicación 22, en el que

R^{12} es H y

R^{13} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

R^{14} es $-(CH_2)_rC(O)NR^{15}(CH_2)_s(D)_tR^{16}$, en la que

r es 1,

R^{15} es H,

s es 2,

t es 0 y

R^{16} es succinimidilo o maleimidilo.

25. Compuesto según la reivindicación 22, en el que

R^{12} es H y

R^{13} es H o alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono,

R^{14} es $-(CH_2)_rC(O)NR^{15}(CH_2)_s(D)_tR^{16}$, en la que

r es 1,

R^{15} es H,

s es 2,

D es S,

5 t es 1 y

R^{16} es $-(CH_2)_qC(O)NR^{17}R^{18}$,

q es 1,

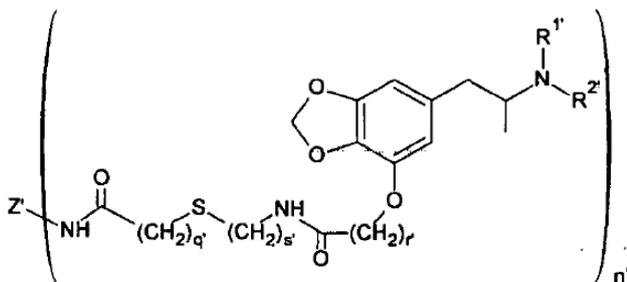
10 R^{17} es H y

R^{18} es un poli(amino)ácido o una partícula.

15 26. Compuesto según la reivindicación 25, en el que

R^{18} es una partícula.

20 27. Compuesto según la reivindicación 22 de fórmula:



en la que:

25 R^1 es H,

R^2 es H, metilo o etilo

30 r es de 1 a 5,

s es de 1 a 5,

q es de 1 a 5,

35 Z es un proteína inmunogénica o un portador inmunogénico distinto de poli(amino,ácido),

n es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha proteína inmunogénica o

dicho portador inmunogénico dividido entre aproximadamente 500.

40 28. Anticuerpo producido contra un compuesto según la reivindicación 17 ó 19, en el que dicho poli(amino)ácido es un inmunógeno.

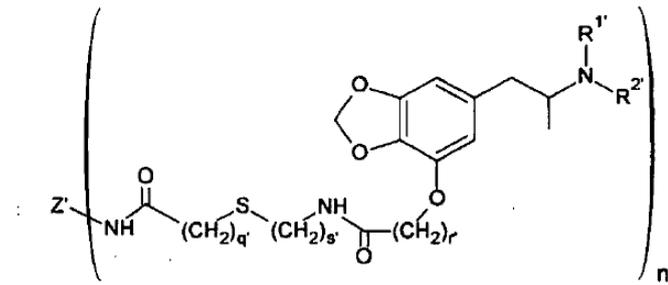
45 29. Sistema de reactivos que comprende (i) un compuesto según la reivindicación 17 ó 19, en el que dicho poli(amino)ácido es una enzima, y (ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un anticuerpo para metilendioximetanfetamina y/o un anticuerpo para metilendioxietanfetamina.

30. Método para determinar 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:

50 (a) proporcionar en combinación en un medio:

- (i) dicha muestra y
- (ii) un sistema de reactivos según la reivindicación 29; y
- 5 (b) examinar dicho medio para determinar 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, indicando la presencia de los mismos la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 10 31. Método según la reivindicación 30, en el que dicho examen comprende la medición de la señal de dicha enzima, estando relacionada la cantidad de la misma con la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 15 32. Método según la reivindicación 31, en el que dicho método es un método homogéneo y dicho medio se examina para determinar la cantidad de dicha señal.
- 20 33. Método según la reivindicación 31, en el que dicho método es un método heterogéneo y dicho complejo, si está presente, se separa de dicho medio y se examina dicho medio o dicho complejo para determinar la cantidad de dicha señal.
- 25 34. Método para determinar 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:
- (i) dicha muestra,
- 30 (ii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iv) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- 35 (v) un compuesto según la reivindicación 47 ó 48, en el que $y'=1$; y
- (b) examinar dicho medio para determinar la presencia de un complejo que comprende dicha metilendioxianfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxianfetamina y/o un complejo de dicha metilendioximetanfetamina y dicho anticuerpo dicha metilendioximetanfetamina y/o un complejo de dicha metilendioxietanfetamina y dicho anticuerpo para metilendioxietanfetamina, indicando la presencia de los mismos la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 40 35. Método según la reivindicación 34, en el que dicho examen comprende la medición de la señal de dicha enzima, estando relacionada la cantidad de la misma con la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 45 36. Método según la reivindicación 35, en el que dicho método es un método homogéneo y dicho medio se examina para determinar la cantidad de dicha señal.
- 50 37. Método según la reivindicación 35, en el que dicho método es un método heterogéneo y dicho complejo, si está presente, se separa de dicho medio y se examina dicho medio o dicho complejo para determinar la cantidad de dicha señal.
- 55 38. Método según la reivindicación 34, en el que dicha enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- 60 39. Método para determinar 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:
- (i) dicha muestra,
- 65 (ii) 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,
- 5 (iii) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 27, en el que R² es H o 21 en el que R¹ es H; y/o
- (iv) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 27, en el que R² es metilo o 21 en el que R¹ es metilo; y/o
- 10 (v) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 27 en el que R² es etilo o 21 en el que R¹ es etilo; y
- (b) examinar dicho medio para determinar 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, indicando la presencia de los mismos la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 15
- 20 40. Método según la reivindicación 39, en el que dicho examen comprende la medición de la señal de dicha enzima, estando relacionada la cantidad de la misma con la presencia de dicha metilendioxianfetamina y/o metilendioximetanfetamina y/o metilendioxietanfetamina en dicha muestra.
- 25 41. Método según la reivindicación 40, en el que dicho método es un método homogéneo y dicho medio se examina para determinar la cantidad de dicha señal.
42. Método según la reivindicación 40, en el que dicho método es un método heterogéneo y dicho complejo, si está presente, se separa de dicho medio y se examina dicho medio o dicho complejo para determinar la cantidad de dicha señal.
- 30 43. Método según la reivindicación 40, en el que dicha enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
44. Kit que comprende en combinación envasada:
- 35 (i) un anticuerpo para metilendioxianfetamina, y/o
- (ii) un anticuerpo para metilendioximetanfetamina, y/o
- (iii) un anticuerpo para metilendioxietanfetamina, y
- 40 (iv) un compuesto según la reivindicación 47, en el que R¹ es H y R² es H, metilo o etilo o un compuesto según 48 en el que R¹ es H, metilo o etilo.
- 45 45. Kit según la reivindicación 44, en el que dicha enzima es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
46. Kit que comprende en combinación envasada:
- 50 (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, produciéndose dicho anticuerpo contra un compuesto según la reivindicación 21 ó 27.
- 55 47. Compuesto según la reivindicación 1 que tiene la fórmula:

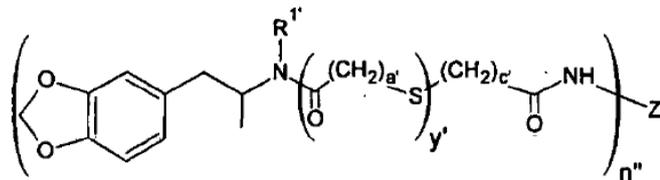


en la que:

- 5 R^{1'} es H, alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector,
 R^{2'} es H, alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector,
 10 r' es de 1 a 5,
 s' es de 1 a 5,
 q' es de 1 a 5,
 15 Z' es una enzima,
 n' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha enzima dividido entre aproximadamente 500.

48. Compuesto según la reivindicación 9 que tiene la fórmula :

20



en la que:

- 25 R^{1'} es H, alquilo inferior de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo protector,
 a' es de 1 a 5,
 30 y' es 0 ó 1,
 Z'' es una enzima,
 c' es de 1 a 5,
 35 n'' es un número entero entre 1 y el peso molecular de dicha enzima dividido entre aproximadamente 500.

FIG. 1

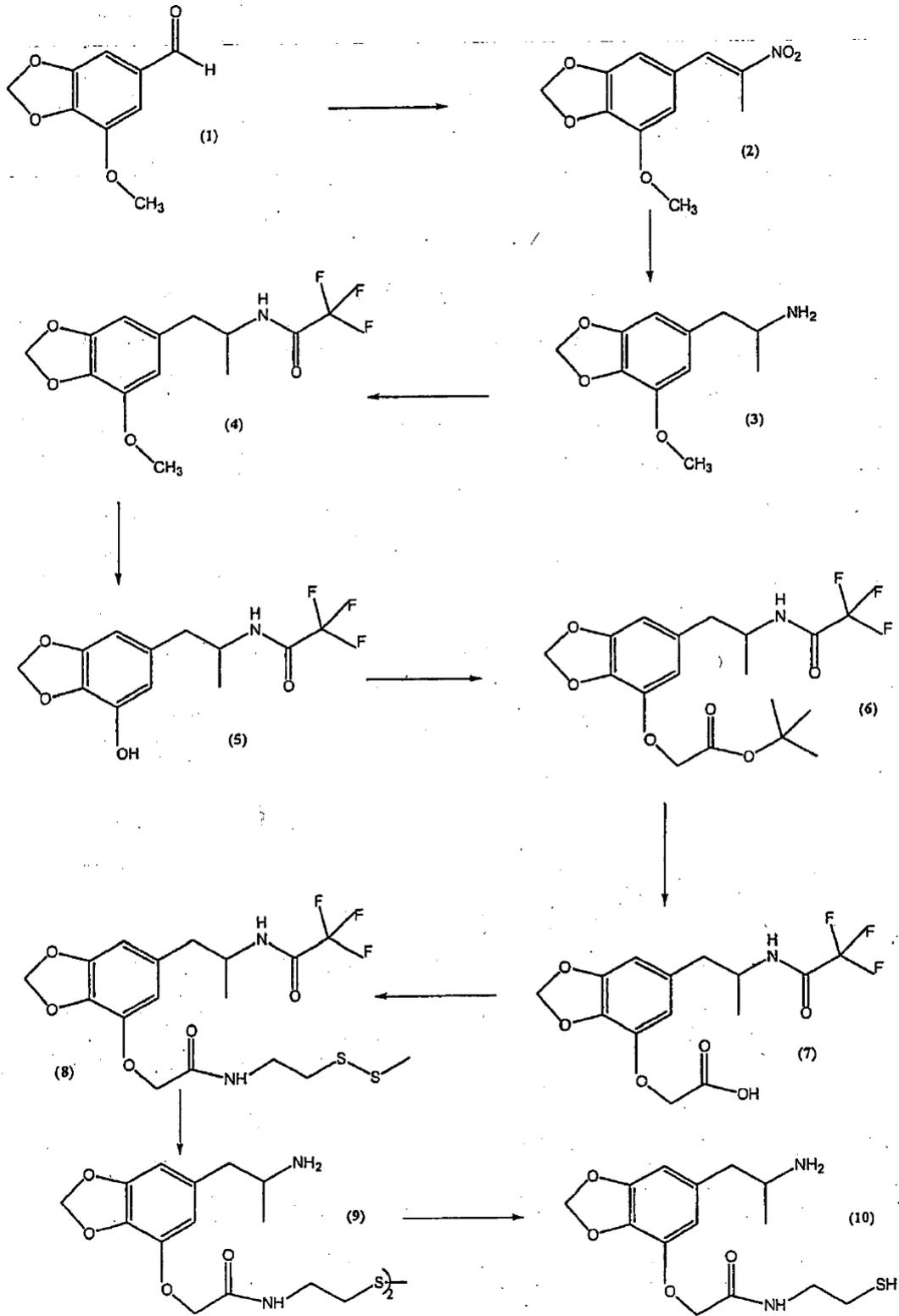


FIG. 2

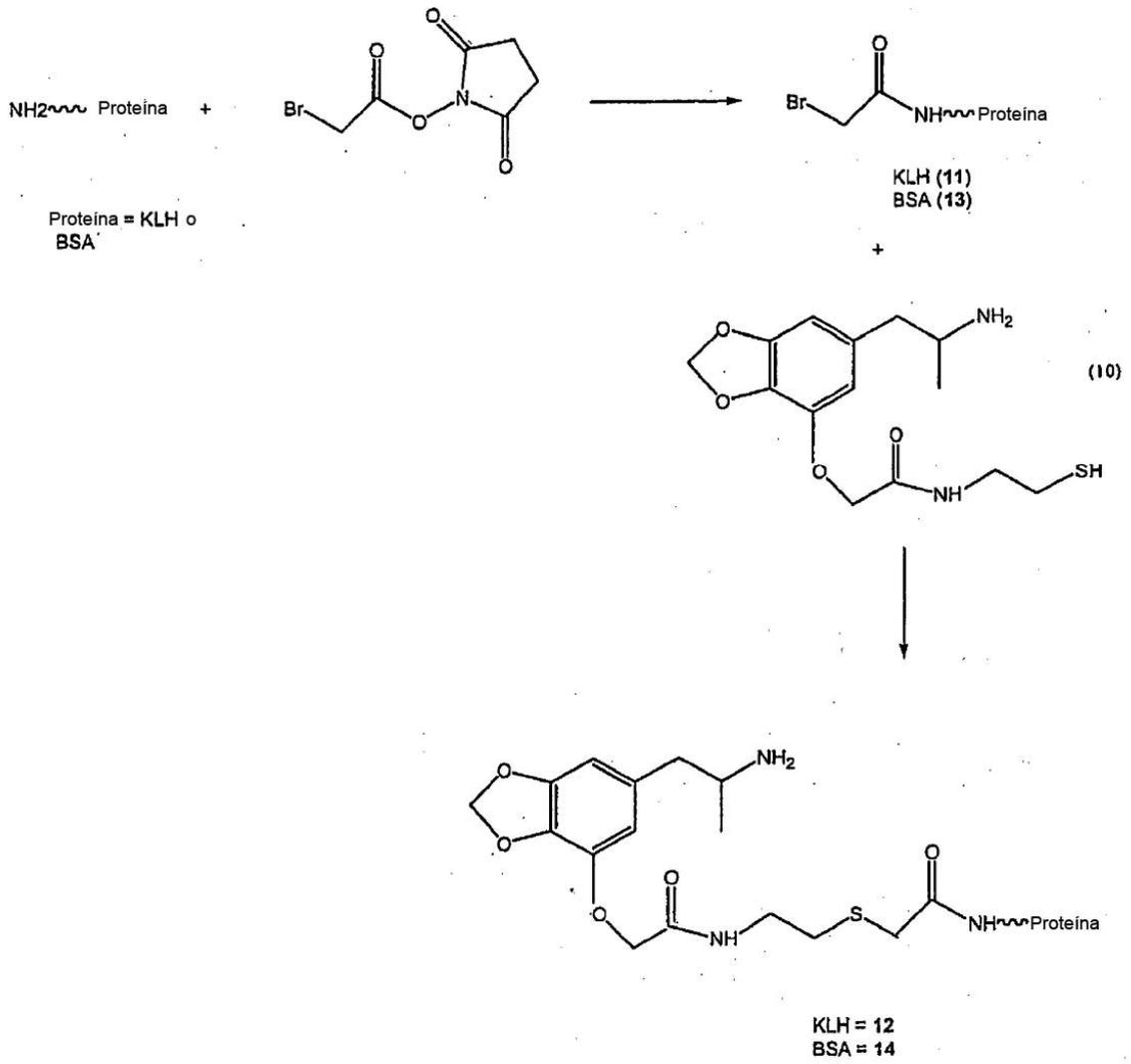


FIG. 3

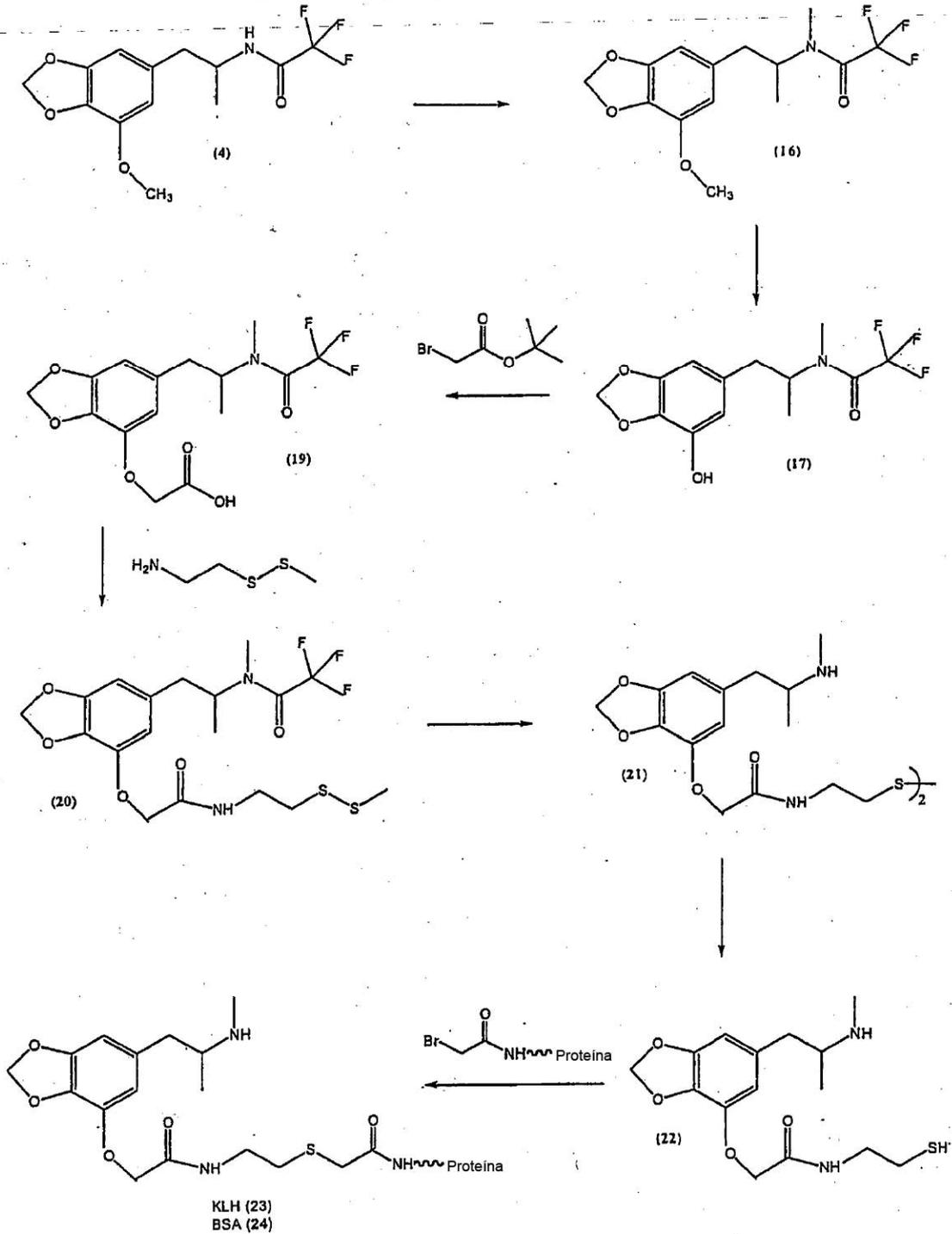
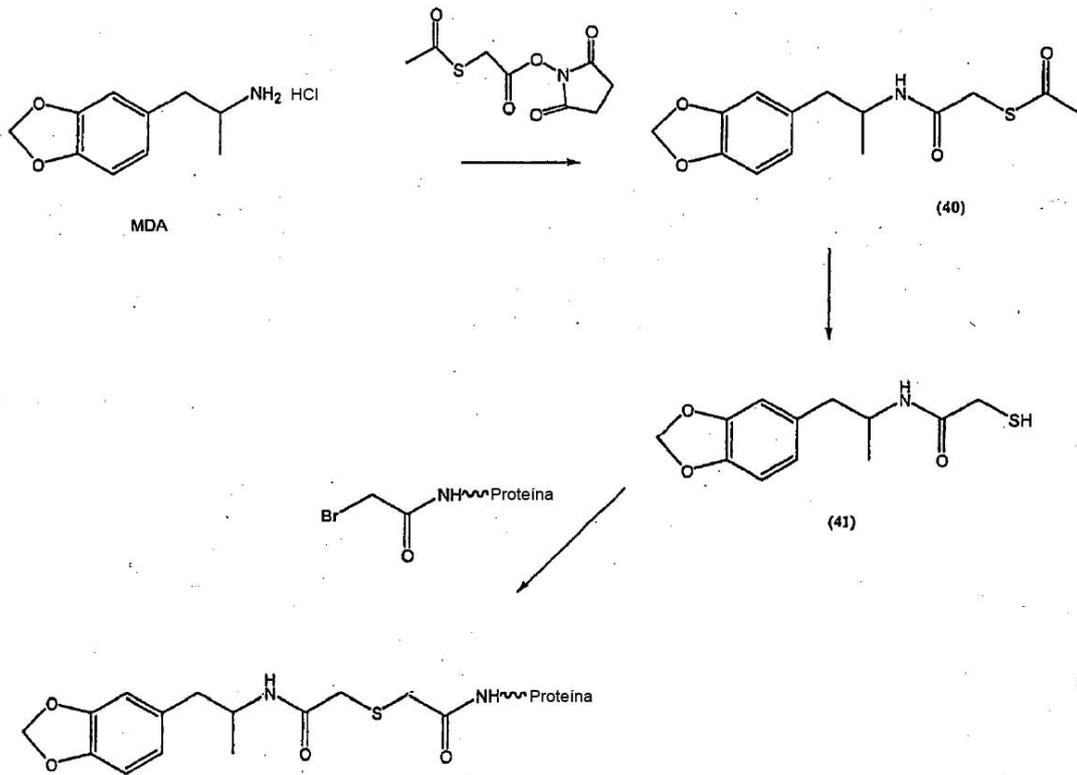


FIG. 5



KLH = 42
BSA = 43

FIG. 6

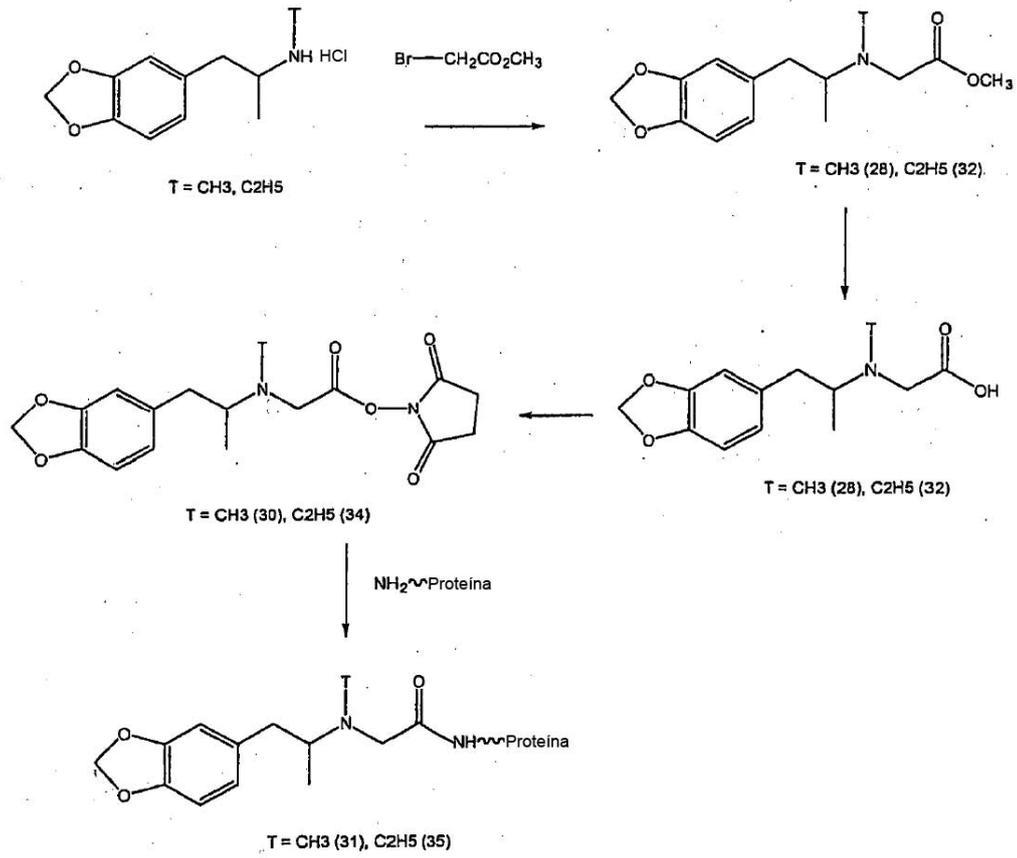


FIG. 7

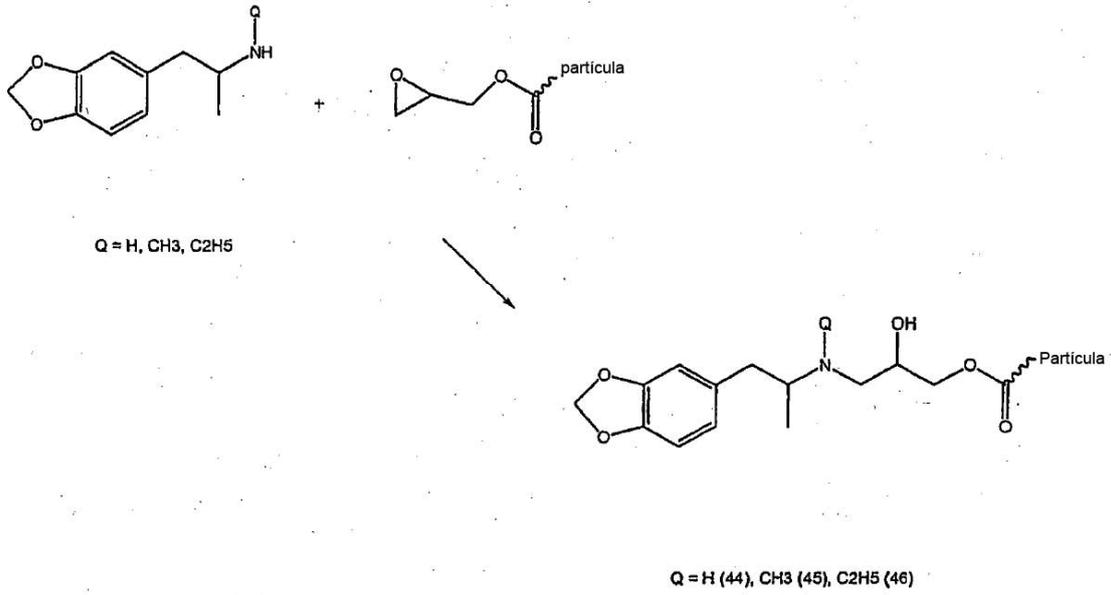
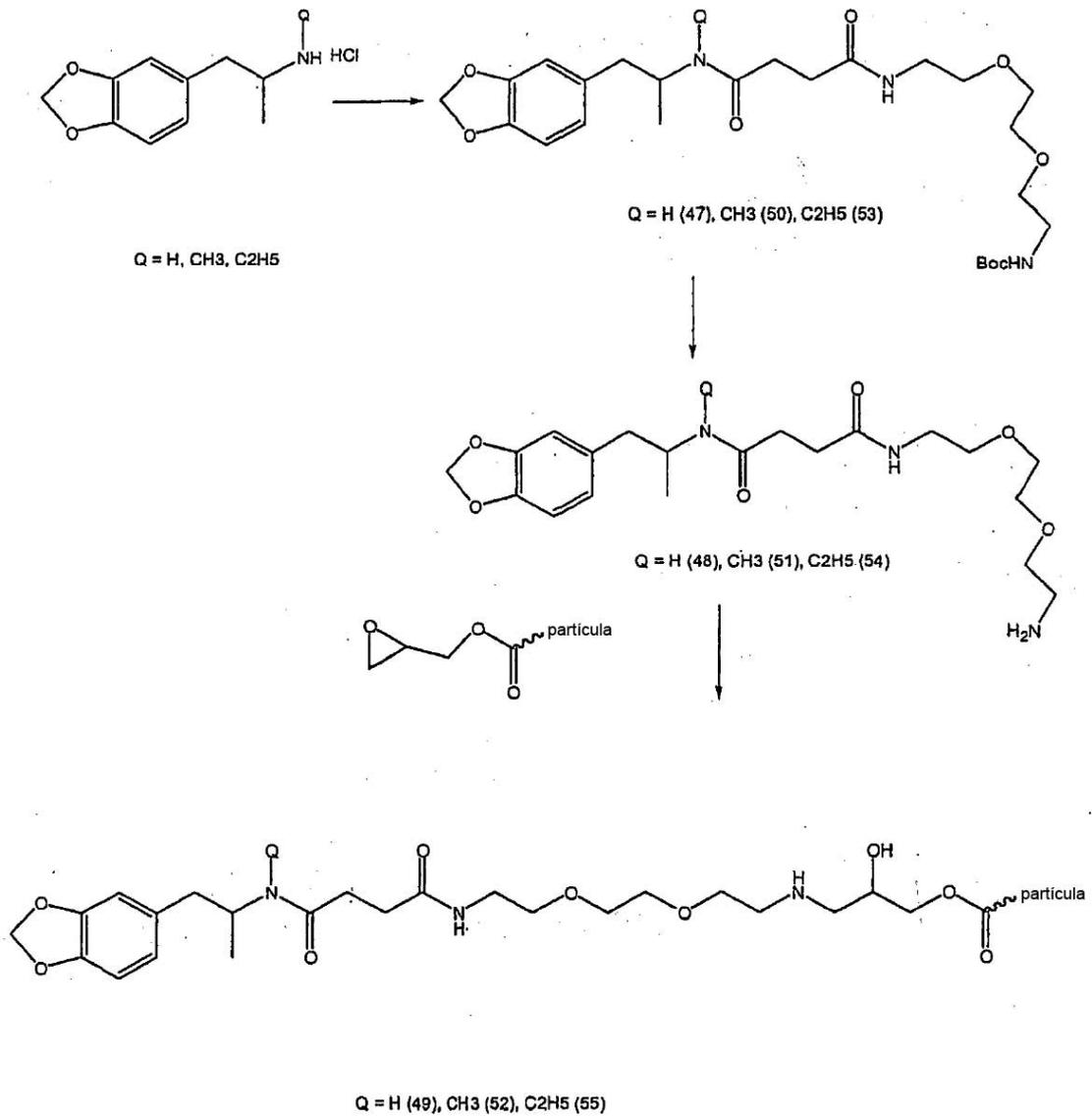


FIG. 8



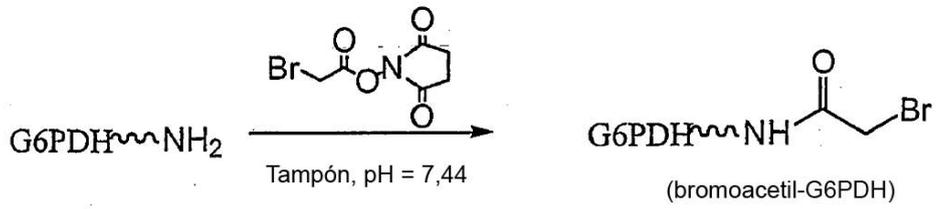


FIG. 9

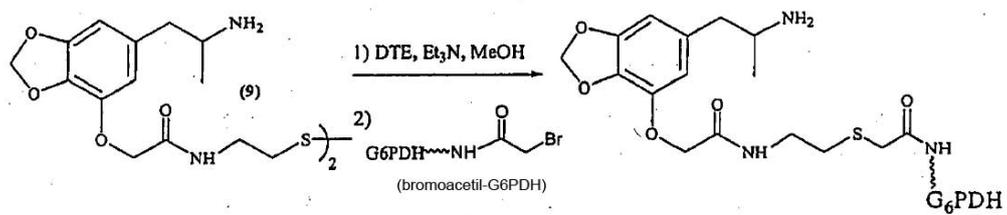


FIG. 10

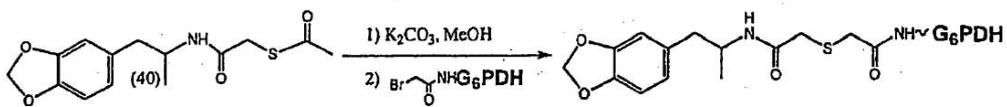


FIG. 11