

# Anticuerpos monoclonales y su empleo para identificar morfina en fluidos biológicos: una revisión sistemática

Maura Epifanía Matus Ortega<sup>1</sup>, Juan Carlos Calva Nieves<sup>1</sup>, Alberto Salazar Juárez<sup>1</sup>, Susana Barbosa Méndez<sup>1</sup>, Genaro Matus-Ortega<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Subdirección de Investigaciones Clínicas. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

## RESUMEN

**Introducción:** el consumo indiscriminado de opioides ha incrementado el trastorno por dependencia, con el que se han relacionado medio millón de muertes en el mundo en el último año. Esto justifica explorar terapias alternativas para el tratamiento de la adicción y emergencias por sobredosis. A partir del desarrollo experimental de vacunas contra estas drogas, se han producido anticuerpos monoclonales específicos para morfina y sus metabolitos para utilizarlos en pruebas analíticas de identificación en fluidos biológicos. **Objetivo:** revisar publicaciones científicas sobre anticuerpos monoclonales que identifican a la morfina y a sus metabolitos, conocer sus propiedades y los alcances de su implementación en pruebas para diagnóstico. **Método:** búsqueda sistemática de la literatura científica en las bases de datos PubMed, ScienceDirect, SciELO y LILACS, publicados hasta septiembre de 2021. Se incluyeron artículos sobre la generación de anticuerpos monoclonales para morfina y sus metabolitos, y se excluyeron los especializados únicamente en estructura molecular, mutaciones puntuales y dinámica molecular computacional. **Resultados:** se identificaron 18 artículos donde se reportó la producción de 61 anticuerpos monoclonales específicos para morfina y/o sus metabolitos, en los que caracterizaron la especificidad, sensibilidad y/o el rango de detección de los anticuerpos al evaluar 46 sustancias diferentes, acopladas a pruebas de diagnóstico. **Discusión y conclusiones:** la producción de anticuerpos monoclonales con alta sensibilidad y reconocimiento por la morfina y sus metabolitos ha permitido emplearlos en el desarrollo de pruebas analíticas sensibles, de costo asequible, que se pueden implementar en el diagnóstico clínico y en la vigilancia del uso de estas sustancias en la población.

**Palabras clave:** anticuerpos monoclonales, morfina, adicción, diagnóstico.

## ABSTRACT

**Introduction:** indiscriminate use of opioids has increased dependency disorder and has been linked to half a million deaths worldwide in the last year. This justifies the exploration of alternative therapies for the treatment of addiction and overdose emergencies. Specific monoclonal antibodies have been produced for morphine and its metabolites for use in analytical identification tests in biological fluids from the experimental development of vaccines against these drugs. **Objective:** review scientific publications on monoclonal antibodies that identify morphine and its metabolites, to know its properties and the scope of its implementation in diagnostic tests. **Method:** systematic research of scientific literature in PubMed, ScienceDirect, SciELO and LILACS databases, published until September 2021, including articles on generation of monoclonal antibodies for morphine and its metabolites, and excluding those specialized only in molecular structure, point mutations and computational molecular dynamics. **Results:** 18 articles were identified where the production of 61 specific monoclonal antibodies for morphine and/or its metabolites was reported, and in which they characterized the specificity, sensitivity and/or detection range of the antibodies by evaluating 46 different substances, coupled to diagnostic tests. **Discussion and conclusions:** The production of monoclonal antibodies with high sensitivity and recognition for morphine and its metabolites has allowed their use in the development of sensitive analytical tests at affordable cost, which can be implemented in the clinical diagnosis and the surveillance of the use of these substances in the population.

**Keywords:** monoclonal antibodies, morphine, addiction, diagnostic.

## Autor de correspondencia:

Maura Epifanía Matus Ortega

Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones, Subdirección de Investigaciones Clínicas. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Calzada México-Xochimilco núm.101. C. P. 14370. Ciudad de México, México. Tel.: 252 4160 5115  
Correo electrónico: mematuso@yahoo.com

Recibido: 14 de enero de 2022

Aceptado: 1 de diciembre de 2022

doi: 10.2893/riiad.2023.1.09

## INTRODUCCIÓN

Durante el último año, 58 millones de personas en el mundo consumieron opioides y se atribuye medio millón de muertes al consumo de drogas a nivel mundial, de las cuales más del 70% están relacionadas con los opioides, con un 30% causadas específicamente por sobredosis (World Drug Report, 2021). Las personas con dependencia a opioides experimentan serios problemas de salud, como enfermedades infecciosas y mentales, alta mortalidad por sobredosis, suicidios y muertes traumáticas. El cuidado médico para las comorbilidades resulta un problema grave de salud pública. Los opioides actúan en el sistema nervioso central y periférico sobre receptores específicos que modulan analgesia y se emplean para tratar el dolor crónico. Sin embargo, la inclusión de opioides sumamente potentes en el mercado de drogas ilícitas ocasiona muertes por sobredosis (Volkow et al., 2019). La morfina es un potente analgésico opioide ampliamente utilizado en la práctica clínica, y es precursor de la heroína, una de las principales sustancias de abuso.

Según la última Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT) 2016-2017, en México el consumo de heroína el último año fue de aproximadamente 145,382 personas, su consumo se incrementó respecto al conteo anterior y se ha extendido prácticamente a todos los estados de la república, siendo de mayor prevalencia los estados de Baja California y Chihuahua. El 96,8% de los usuarios de heroína se la administran a diariamente vía intravenosa en un promedio de cinco veces al día, pero pueden inyectarse hasta 10 veces. El 70% de los usuarios ha experimentado sobredosis al menos una vez en la vida, y en promedio han sufrido 4,2 sobredosis. Las razones que provocan las sobredosis incluyen la potencia variable de la sustancia, la combinación de la heroína con otras sustancias de abuso (cristal, cocaína, alcohol y medicamentos controlados), exceso en la cantidad administrada y falta de tolerancia (abstinencia involuntaria; Fleiz-Bautista et al., 2019).

Los pacientes con trastorno de abuso requieren de tratamientos de sustitución farmacológica. Actualmente existen tres medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos de América, que actúan sobre el receptor opioide mu: metadona como agonista total, buprenorfina como agonista parcial y naltrexona como antagonista opioide. Sin embargo, se ha demostrado que la terapia de sustitución aguda o crónica afecta las funciones del sistema opioide endógeno y provoca un desequilibrio que promueve estados patológicos, como el distanciamiento social y el deterioro en la respuesta a estresores sociales, y que provoca

dependencia a los fármacos opioides para compensar las funciones endógenas que se han deteriorado. Estos tratamientos también producen efectos secundarios en el sistema gastrointestinal, problemas cardíacos, cambios hormonales y alteraciones inmunológicas (Khademi et al., 2016) que interfieren negativamente en el éxito de las terapias de sustitución e incrementan el riesgo de recaídas.

Ante la necesidad de terapias alternativas para el tratamiento de la adicción a los opioides y para atender las emergencias por sobredosis, varios grupos de investigación han implementado terapias inmunofarmacológicas que se pueden consultar en la revisión actualizada de literatura científica reciente de Townsend & Banks (2020), que enfatizan las evaluaciones preclínicas de las vacunas desarrolladas.

A partir del desarrollo de vacunas para sustancias de abuso y con ayuda de herramientas biotecnológicas, se produjeron anticuerpos monoclonales (en acrónimo mABs, del inglés monoclonal antibodies) diseñados para unirse a un determinante antigénico específico. Los mABs son producidos por clones de una única célula B a partir de técnicas de cultivo, como se esquematiza en la Figura 1, y posteriormente, por tecnologías de ADN recombinante, empleando sistemas de expresión celular de mamíferos. Los mABs son reactivos ampliamente utilizados en el diagnóstico y terapia clínica de enfermedades como el cáncer. Sin embargo, como los fármacos de prescripción, se requieren de pruebas preclínicas de laboratorio antes y después de los tratamientos terapéuticos con mABs para identificar a los pacientes sensibles, verificar su estado de salud y evaluar la respuesta al tratamiento.

Consideramos necesario conocer y difundir la investigación científica generada en torno a la heroína y la morfina como sustancias de abuso. A la fecha, no encontramos una publicación que reúna información sobre la variedad de mABs específicos para estas sustancias, sus propiedades y sus posibilidades de uso. Resulta importante mostrar los esfuerzos de la comunidad científica que genera productos biotecnológicos para implementar pruebas de diagnóstico sensibles, de bajo costo y asequibles, en salas de emergencia, laboratorios clínicos y consultorios para supervisar y monitorear el consumo de estas sustancias en la población usuaria y/o en tratamiento de desintoxicación. En este sentido, la identificación de morfina en fluidos biológicos para vigilar el consumo de heroína obedece a que esta última tiene una vida media de dos a cuatro minutos en torrente sanguíneo, y es metabolizada rápidamente a 6-monoacetilmorfina (6-MAM), morfina, morfina-6-glucurónido (M6G) y morfina-3-glucurónido (M3G), cuyas estructuras se esquematizan en la Figura 2A, lo que descarta a

Figura 1

Metodología clásica para la producción de anticuerpos monoclonales en ratones.



Inicialmente se sintetiza el inmunógeno o antígeno de interés con el que se inmunizan ratones, y se extraen las células B a partir de los bazos de los ratones productores de anticuerpos policlonales en respuesta a la inmunización. Se fusionan las células B con células neoplásicas de mielomas para obtener hibridomas que son células de fusión que combinan ciertas ventajas de sus progenitores: la capacidad de producir grandes cantidades de un único anticuerpo, propia de las células B, y la capacidad de multiplicarse indefinidamente, característica de las células neoplásicas. A continuación, se llevan a cabo ensayos de identificación y caracterización de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridomas recién formadas para seleccionar a las clonas capaces de producir los anticuerpos deseados y se expande la clona o clonas de interés. Como resultado se obtiene una fuente casi inagotable de anticuerpos producidos por un clon celular, derivados de una única célula B, que son idénticos y específicos de epítomos.

la heroína como analito blanco en fluidos biológicos (Dinis-Oliveira, 2019).

## MÉTODO

Se llevó a cabo un escrutinio documental de la literatura científica disponible en las bases de datos PubMed, ScienceDirect, SciELO y LILACS para seleccionar los artículos que reportaron la generación de mAbs que identifican a la morfina, la heroína y las sustancias estrechamente relacionadas, para conocer sus propiedades de afinidad y especificidad, y los alcances de su implementación en diferentes pruebas de utilidad en diagnóstico clínico. El rango de años de las publicaciones se estableció desde el disponible para cada base de datos hasta septiembre de 2021. Se utilizaron pala-

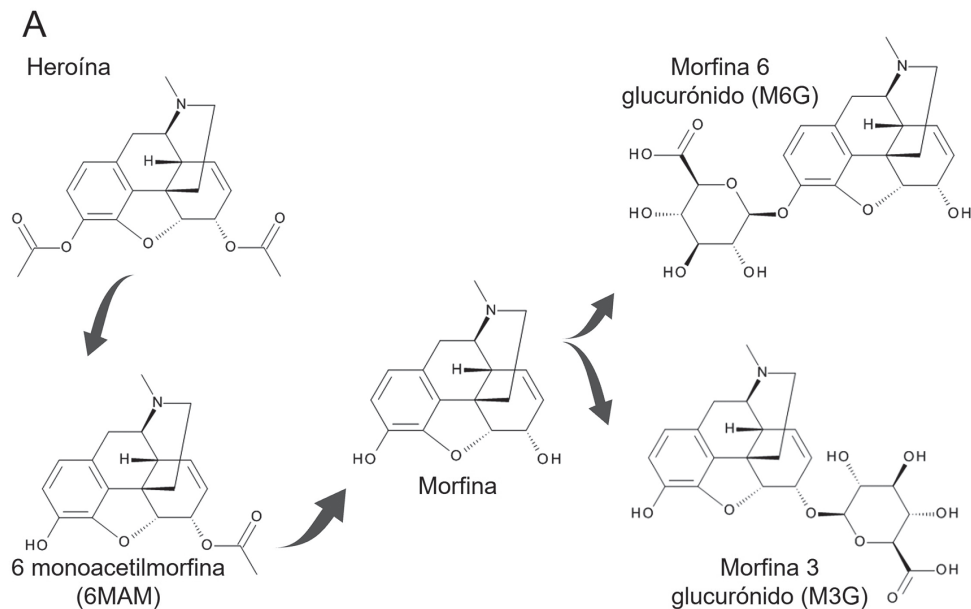
bras clave (anticuerpos monoclonales y morfina) y sus combinaciones en español e inglés. Se contabilizó el total de resultados obtenidos en el rastreo inicial y se aplicaron los criterios de selección para elegir los artículos con las características necesarias para efectuar una revisión a profundidad, apelando a un minucioso proceso de lectura crítica de acuerdo con las recomendaciones de la guía PRISMA (Page et al., 2021) como se indica en la Figura 3.

## Criterios de inclusión

Se seleccionaron artículos donde se generaron mAbs de origen murino para morfina y heroína, y se incluyeron dos artículos encontrados a través de las referencias. Se incluyeron los artículos completamente accesibles en versión electrónica.

Figura 2 A

La morfina y las sustancias relacionadas.



Esquema general del metabolismo de la heroína y la morfina. La heroína se metaboliza rápidamente (2–4 minutos) en 6 monoacetilmorfina y posteriormente en morfina. A su vez, la morfina es metabolizada en morfina 3 glucurónido (90%) y en morfina 6 glucurónido (10%). Las diferencias en la estructura de cada una de estas moléculas determinan sus propiedades farmacológicas y, en el tema que nos ocupa, permiten evaluar la especificidad de los anticuerpos y explicar que los anticuerpos generados tengan reconocimiento cruzado por estas moléculas.

## Criterios de exclusión

Se excluyeron los artículos duplicados, los que están en lengua diferente a la inglesa y española. Cabe mencionar que se incluyó la información de un artículo en ruso con resumen en inglés, que es el antecedente de otro artículo relevante para la revisión. Se excluyeron los artículos sobre mABs generados a partir de especies diferentes a murinos (conejos, humanos), los que evaluaron afinidad de los mABs tras la inclusión de mutaciones puntuales, los estudios exclusivamente de dinámica molecular y los que emplearon a los mABs para el estudio del fenómeno adictivo en modelos de animales de laboratorio. El cribado de cada publicación recuperada se llevó a cabo por dos autores de manera independiente. Para la síntesis, los estudios se agruparon en trabajos pioneros, estudios orientados a acoplar a los mABs a pruebas de diagnóstico, estudios que determinaron reactividades cruzadas, constantes de afinidad y límites de detección de los mABs y estudios orientados a producir anticuerpos recombinantes. De los artículos seleccionados, se extrajo información referente a los autores, la fecha de publicación, la metodología (procedimientos, técnicas

y herramientas de medición) y los hallazgos de mayor relevancia con relación a la afinidad y especificidad de los mABs específicos para morfina y su implementación en pruebas diagnósticas. En el tabulado de datos se ordenaron e incluyeron los mABs con mayor afinidad para cada referencia, se homogenizaron las unidades de constantes de afinidad, de disociación, y las unidades de concentraciones para los límites de detección o rango de sensibilidad.

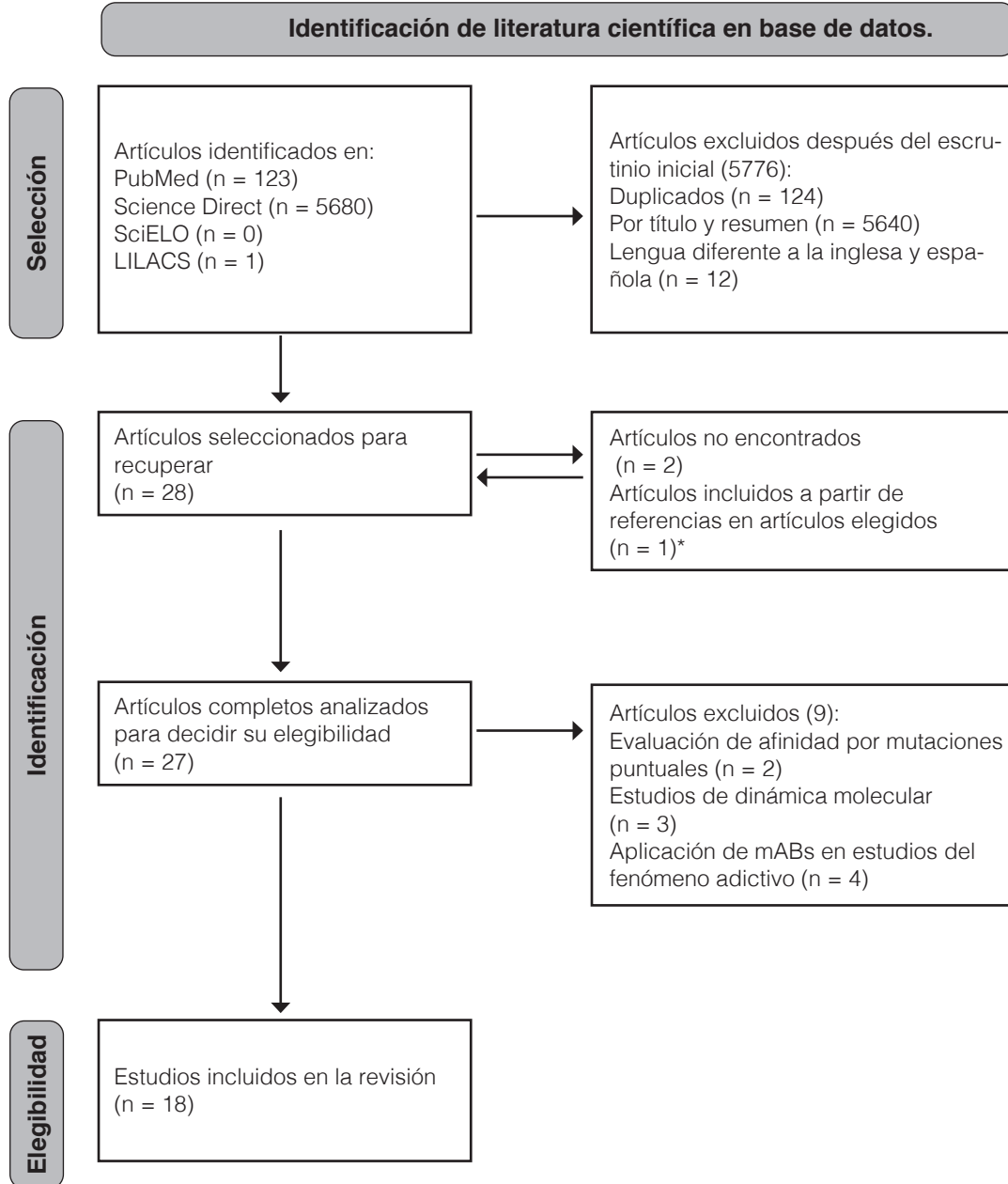
## RESULTADOS

### Trabajos pioneros

El grupo de investigación de Glasel fue el primero en reportar, en 1983, la generación, aislamiento y purificación de cuatro líneas celulares productoras de mABs con alta afinidad por morfina, pero que mostraron reacción cruzada con los opioides clásicos evaluados. Determinaron las conformaciones flexibles de los ligandos opioides en los sitios de unión, los parámetros termodinámicos y los aminoácidos importantes involucrados en la unión antígeno-anticuerpo.

Figura 3

Diagrama de flujo del escrutinio en la literatura científica de acuerdo con los criterios PRISMA 2020 para la identificación e inclusión de estudios de esta revisión.



En la búsqueda inicial, la base de datos de ScienceDirect arrojó 5680 resultados por lo que la búsqueda específicamente en esta base de datos se restringió a artículos de investigación y para precisar la indagación se contempló el uso del diccionario controlado de términos (tesauro) disponible para cada buscador. Asimismo, se emplearon operadores booleanos (AND, OR y NOT). Los criterios de selección se detallan en la sección de Método del texto. \*Como excepción, se incluyó un artículo en ruso cuyo resumen está en inglés, que es el antecedente de un artículo en inglés que se incluyó en la revisión y cuyo análisis es relevante. El diseño del diagrama se basó en Page et al., 2021.

Posteriormente, el grupo de Sawada (1988) obtuvo 12 líneas celulares productoras de mABs con alta reactividad cruzada por los agonistas opioides y baja por los antagonistas naloxona y naltrexona, y ninguno mostró reactividad cruzada por los péptidos opioides en las condiciones evaluadas. El mAB MOR 131,5,13 mostró la más alta capacidad de unión por morfina, permitiendo proponer su utilidad para identificar morfina en análisis forenses.

### Estudios para la generación de pruebas de análisis diagnóstico

Los métodos de detección de opioides como la cromatografía de gases, de líquidos de alta resolución y electroforesis capilar, tienen desventajas tales como consumir mucho tiempo en su ejecución, alta interferencia con sustancias relacionadas, requieren de equipos costosos, solventes tóxicos y, en algunos casos, las muestras a analizar demandan de un tratamiento complejo previo. Por lo anterior, los grupos de investigación reconocieron la necesidad de implementar métodos que identifiquen la morfina y otros opioides en fluidos biológicos, como suero, orina y saliva, para monitorear e identificar las dosis adecuadas durante el tratamiento con estos analgésicos y prevenir los efectos tóxicos, la muerte por sobredosis y controlar el abuso de estas sustancias.

Se diseñaron métodos alternativos que ofrecen ventajas sobre los existentes: formatos de análisis simples, rápidos, de alto rendimiento, confiables, precisos y, lo más importante, con alta sensibilidad y especificidad

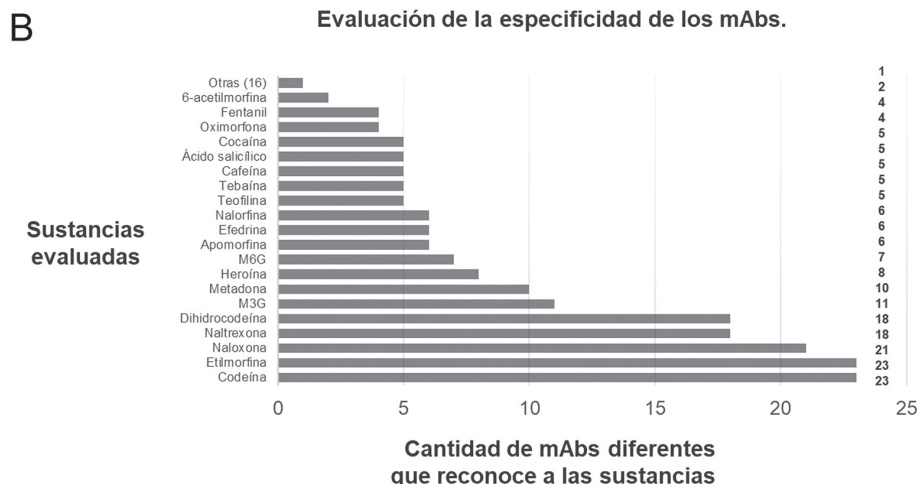
para identificar opioides en muestras biológicas, discriminando con precisión entre los alcaloides análogos de morfina como codeína y tebaína, y que sean accesibles en los laboratorios clínicos. En este contexto, a partir de 1993 surgieron publicaciones orientadas a utilizar a los mABs como reactivos biológicos para la identificación de opioides en muestras biológicas.

### Especificidad y selectividad de los mABs

La especificidad de un mAB es su capacidad para interactuar exclusivamente con su hapteno, por otro lado, mediante ensayos de reactividad cruzada se evalúa el reconocimiento inespecífico del anticuerpo por diferentes moléculas estructuralmente relacionadas con el hapteno. La especificidad sirve también como parámetro para evaluar la selectividad de un inmunoensayo, y se calcula generalmente sobre la base del valor de la concentración inhibitoria 50: IC<sub>50</sub>, en la curva de competencia para cada una de las sustancias analizadas.

De los artículos revisados, 10 determinaron las reactividades cruzadas de sus mABs por metabolitos de morfina y sustancias estructural y farmacológicamente relacionadas; reportando valores de porcentajes (seis artículos) y de IC<sub>50</sub> (cuatro artículos) a partir de curvas de desplazamiento de morfina por cada una de las sustancias. Se analizó la reactividad cruzada de 32 anticuerpos diferentes por 37 sustancias químicas distintas. En la Figura 2B se graficó el número de mABs que identificó a cada sustancia evaluada, además de la morfina.

Figura 2 B  
Especificidad de los mABs.



Durante la caracterización de los mABs, los grupos de investigación evaluaron la especificidad de 32 mABs por diferentes sustancias, además de la morfina, mediante dos métodos detallados en el texto. Las 16 sustancias que fueron reconocidas sólo por un anticuerpo son: 3-acetilmorfina, norcodeína, papaverina, codeína-6-glucurónido, ketamina, oxycodona HCl, benzoilecgonina, etorfina, metaqualona, buprenorfina-6-glucurónido, anfetamina HCl, metanfetamina HCl, ecgonina, ecgonina metil éster, cocaína HCl y cocaetileno.

Algunos mABs tuvieron reacción cruzada, del 100%, con las sustancias opioides estrechamente relacionadas: los metabolitos de morfina, codeína, oxicodona y apomorfina (79 - 89.5%), y otros mostraron importante reacción cruzada por naloxona (hasta 52%; Eldefrawi et al., 2000; Rahbarizadeh et al., 2000). Destaca que algunos mABs mostraron reacción cruzada del 100% o más, por sustancias no relacionadas como cafeína (130%), tebaína (120%), teofilina (100%) y efedrina (100%; Rahbarizadeh et al., 2000). El resto de las sustancias evaluadas fue reconocido en porcentajes menores a 29,9%.

De los cinco mABs de Rahbarizadeh destacan los mABs MOR-III y MOR-V con menor reacción cruzada por las sustancias estrechamente relacionadas (Rahbarizadeh et al., 2000). El mAB comercial de Eldefrawi mostró alta reacción cruzada por los metabolitos de la morfina, M6G y M3G, el metabolito de codeína codeína-6-glucurónico (C6G) y por el clorhidrato de oxicodona, y mostró baja reacción cruzada por metadona y benzoilecgonina (Eldefrawi et al., 2000).

El mAB Amor-HK-16 mostró alta reacción cruzada por codeína, baja por apomorfina y prácticamente nula por otras sustancias evaluadas (Paknejad, 2010). El mAB E3 mostró baja reacción cruzada por heroína, pero mayor que el reconocimiento por morfina y la mitad del valor por 3-monoacetilmorfina (3-MAM) y también reconoce a norcodeína (Dillon et al., 2003). El mAB de Cao mostró baja reacción cruzada con las sustancias evaluadas (<0,05% - 8.8) respecto al 100% por morfina (Cao et al., 2019).

La reacción cruzada en valores de  $IC_{50}$  se determinó para un total de 23 mABs evaluando la inhibición de la unión de morfina a los mABs por diferentes sustancias. Los mABs de Glasel (1983) y de Matsukizono (2013) reportaron valores de  $IC_{50}$  en concentraciones molares. El mAB 3B9 de Glasel resultó de mayor afinidad por morfina (13 nM), seguido por el scFv (acrónimo en inglés para single-chain variable fragment) identificado como M86-scFv (36.4 nM) de Matsukizono, pero tanto el 3B9 como el M86-scFv mostraron aún mayor afinidad por codeína (10 nM), y por codeína y heroína (7.3 y 7.4 nM), respectivamente.

El mAB 12D4 de Glasel (1983) es el más específico, con alta afinidad de reconocimiento por morfina (46 nM) y considerablemente baja (250 - 10,000 nM) por las demás sustancias evaluadas: codeína, nalorfina, oximorfona, naloxona, fentanilo y metadona.

Los mABs de Sawada (1988) y Usagawa (1993) fueron comparables entre sí. Todos los mABs de Sawada reconocieron con alta afinidad a codeína, más que por morfina, a etilmorfina y dihidrocodeína, lo que los vuelve menos específicos, y mostraron reacción cruzada relativamente baja por naloxona y naltrexona. En contraste, los mABs MO-1, -4, -5 y -6 de Usagawa reconocieron

con alta afinidad a nalorfina pero menor que a morfina (Usagawa et al., 1993). Los MO-2 y -3 son menos específicos, MO-2 reconoce con alta afinidad a naloxona, naltrexona, nalorfina y M6G, y MO-3 a codeína y nalorfina, pudiendo identificar falsos positivos en pacientes con tratamiento con los fármacos mencionados.

### Afinidad y límites de detección de los mABs

La afinidad describe la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en un solo sitio antigénico, el complejo formado podría disociarse en función de la fuerza de unión, y se determina por la constante de afinidad ( $K_a$ ), que puede abarcar un amplio rango de valores de concentraciones, extendiéndose por debajo de  $10^5 \text{ mol}^{-1}$  hasta más de  $10^{12} \text{ mol}^{-1}$ . La afinidad puede definirse también en términos de la constante de disociación ( $K_D$ ) y sus unidades son moles/L o molaridad (M). En contraste,  $K_a$  se expresa en las unidades  $\text{L/mol}$  o  $\text{M}^{-1}$  y cuanto mayor es la fuerza de unión, la cifra es más alta.

Se comparó el valor de la constante de afinidad  $K_a$  de 38 mABs, en unidades de concentraciones molares ( $\text{M}^{-1}$ ) que reportaron siete artículos, y los mABs de muy alta afinidad se recopilaron en la Tabla 1. Respecto a las constantes de disociación  $K_D$ , recopiladas también en la Tabla 1, el mAB comercial evaluado por Eldefrawi (2000), anti-MOR mostró el menor valor con 0.23 nM, por lo tanto se considera el de mayor afinidad de los 14 mABs comparados. Los mABs de Glasel (1983), Trofimov et al. (2020), y Berzina et al. (2016) también fueron de alta afinidad con valores de 5 - 30, 61 y 123 nM, respectivamente, así como el scFv M86 de Matsukizono (112.6 nM; Matsukizono et al., 2013).

### Sensibilidad, rango de detección y pruebas de diagnóstico

Para considerar el empleo de los mABs en pruebas para diagnóstico clínico, se requiere que tengan alta sensibilidad de reconocimiento por la morfina en las muestras biológicas. La FDA ha establecido como valores de referencia 2000 ng/ml para morfina y 10 ng/ml para 6-MAM.

En la Tabla 2 se reunieron los valores de límites de detección y/o sensibilidad reportados para los mABs acoplados a pruebas diagnósticas. Los de Sawada mostraron mayor sensibilidad de detección, ya que identificaron 28,5 pg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS; Sawada et al., 1988), seguidos por los de Rahbarizadeh y Usagawa (Rahbarizadeh et al., 2000; Usagawa et al., 1993) que identificaron desde 100 pg/ml en PBS y muestras de suero a las que se añadió morfina, y en PBS y en muestras de orina con morfina añadida, respectivamente. El mAB comercial de Eldefrawi tuvo la

sensibilidad para identificar desde 0.2 ng/ml en muestras de orina (Eldefrawi et al., 2000). Cabe destacar que los scFv de Moghaddam mostraron baja afinidad por

morfina, pero reconocieron con alta afinidad a 6-MAM ( $1 - 3 \times 10^{-7}$  M) con una sensibilidad de 50 -100 ng/ml en PBS (Moghaddam et al., 2003).

Tabla 1

*Constantes de afinidad y de disociación de los mABs por morfina.*

Referencias	Nombre de los mABs	Constantes de afinidad: $K_a$ ( $M^{-1}$ )	Constantes de disociación: $K_D$
Glasel et al. (1983)	12D4, 11CF, 10C3, 3B9	$0,3 \times 10^7 - 2 \times 10^8$	$5-30 \times 10^{-9}$ M
Sawada et al. (1988)	131,5,13*	$47 \times 10^9$	ND
Droupadi et al. (1994)	368,21*	$12,8 \times 10^6$	ND
Rahbarizadeh et al. (2000)	MOR-III*	$2,2 \times 10^8$	ND
Yang et al. (2002)	5H5A12H6C2*	$1,1 \times 10^8$	ND
Kashanian et al. (2015)	anti-morphine MAb	$2,8 \times 10^9$	ND
Pozharski et al. (2004)	9B1	$\sim 10^9$	ND
Eldefrawi et al. (2000)	anti-MOR	ND	$0,23 \times 10^{-9}$ M
Moghaddam et al. (2003)	6MAM-219*	ND	$1 \times 10^{-5}$ M
Matsukizono et al. (2013)	M86 (scFv)	ND	$12,6 \times 10^{-9}$ M
Berzina et al. (2016)	6G1	ND	$123 \times 10^{-9}$ M
Trofimov et al. (2020)	3K11	ND	$61 \times 10^{-9}$ M

*Nota: \*Se enumeran los mABs que mostraron mayor afinidad por referencia.*

Tabla 2

*Métodos de diagnóstico implementados acoplado a los mABs y sus valores de límite de detección y/o rango de sensibilidad.*

Referencias	Método de diagnóstico al que se acoplaron los mAB	Límite de detección o rango de sensibilidad
Sawada et al. (1988)	RIA	0,0285 ng/ml en PBS
Usagawa et al. (1993)	ELISA	0,1 ng/ml en suero* y PBS
Rahbarizadeh et al. (2000)	ELISA	0,1 - 10 ng/ml en orina* y PBS
Yang et al. (2002)	ELISA	0,4 - 25,6 ng/ml en PBS
Dillon et al. (2003)	ELISA	3,05 - 195 ng/ml M3G en PBS



Tabla 2

Métodos de diagnóstico implementados acoplado a los mABs y sus valores de límite de detección y/o rango de sensibilidad. (Continuación)

Referencias	Método de diagnóstico al que se acoplaron los mAB	Límite de detección o rango de sensibilidad
Kashanian et al. (2015)	ELISA competitivo directo	50 ng/ml en PBS
	ELISA competitivo indirecto	200 ng/ml en PBS
Eldefrawi et al. (2000)	Inmunoensayo fluorescente	0,2 – 50 ng/ml M3G en orina
Cao et al. (2019)	Inmunoensayo fluorescente competitivo	1 ng/ml en orina
Brennan et al. (2003)	ELISA	Monomérico scFv: 6,1 – 1563 ng/ml en saliva* y PBS
	ELISA	Dimérico scFv-AP: 195 - 50 000 ng/ml en PBS
	BIAcore	Monomérico scFv: 0,000381 – 781.25 ng/ml en PBS
	BIAcore	Dimérico scFv-AP: 6,1 - 12 500 ng/ml en saliva*
Moghaddam et al. (2003)	BIAcore	50 – 100 ng/ml en PBS
Dehghannezhad et al. (2012)	Inmunocromatografía competitiva	2,000 ng/ml en orina

*Nota: Los mABs de Dillon y Moghaddam son scFv. Brennan evaluó diferentes formas de anticuerpos recombinantes. \* La evaluación se realizó en muestras de suero, orina o saliva a las que se le añadieron concentraciones conocidas de morfina. RIA: acrónimo en inglés para Radioimmunoassay. ELISA: acrónimo en inglés para Enzyme-linked immunosorbent assay. PBS: solución salina tamponada con fosfato. El BIAcore es un sistema para la caracterización de interacciones moleculares, mide la afinidad y las constantes de cinéticas y termodinámicas de unión entre las moléculas. scFv: acrónimo en inglés para single-chain variable fragment. scFv-AP: acrónimo en inglés para single-chain variable fragment-alkaline phosphatase.*

### Anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos recombinantes son un tipo de mABs que se generan a partir de genes sintéticos, con propiedades de especificidad y/o afinidades optimizadas mediante metodologías biotecnológicas. Su producción resulta más confiable y su acción es reproducible, requiere menos tiempo y no depende del uso de animales. Son una herramienta útil tanto en investigación como para diagnóstico y tratamiento clínicos.

El grupo de Dillon generó un anticuerpo recombinante del tipo scFv con reconocimiento por M3G para expresar en bacterias de *E. coli*, que reconoce un epítipo común de moléculas relacionadas con M3G y se adecuó a ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés: Enzyme-linked immunosorbent assay) y otro ensayo adaptado para un biosensor BIAcore (Dillon et al., 2003).

Brennan y colaboradores diseñaron y sintetizaron tres modelos diferentes de anticuerpos recombinantes que adaptaron a una prueba rápida para identificar morfina como metabolito de la heroína en muestras de saliva. Los tres modelos de anticuerpos recombinantes fueron monomérico, dimérico y uno de cadena sencilla

marcada con fosfatasa alcalina (fusión scFv-AP). El anticuerpo monomérico mostró un rango de detección de 6 a 1563 ng/ml en PBS. En el anticuerpo dimérico se incrementó la capacidad de unión por la presencia de dos sitios de unión, pero disminuyó la sensibilidad por la morfina libre y mostró un rango de detección de 195 a 50,000 ng/ml en PBS. La forma híbrida que incluyó una fosfatasa alcalina en el extremo carboxilo terminal mostró capacidad de unión a morfina similar a la de la forma dimérica y un rango de detección de 6,1 a 12,500 ng/ml en muestras de saliva con concentraciones conocidas de morfina añadida, y tiene la ventaja de reducir los tiempos de ejecución del ensayo al prescindir de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente. El scFv purificado tuvo alta sensibilidad y especificidad de detección (6 ng/ml en 25 microlitros de PBS), y en el ensayo de ELISA probó ser más sensible para identificar morfina con un rango de detección de 328,5 a 781,250 pg/ml en PBS. Los límites de detección de opiáceos en saliva fueron de 10 ng/ml (Brennan et al., 2003).

Moghaddam y su grupo de investigación aislaron los fragmentos scFv de un anticuerpo que reconoció a 6-MAM, pero no a la morfina, a partir de una biblioteca de anticuerpos inexpertos de linfocitos humanos con la

metodología de despliegue de fagos. Los scFv reconocen a 6-MAM con alta afinidad ( $1 - 3 \times 10^{-7}$ ) y en el rango de 50 -100 ng/ml en PBS (Moghaddam et al., 2003).

El grupo de Matsukizono aisló una única clona de scFv (M86) que se une a morfina-C-conjugada con albúmina sérica bovina (BSA; morfina-C-BSA) y morfina-C conjugada con tiroglobulina (Tg; morfina-C-Tg), pero no a los compuestos relacionados conjugados con BSA o Tg. Su estrategia consistió en generar anticuerpos con reconocimiento específico para morfina que pudieran discriminar entre codeína, tebaína y heroína, evaluando la preparación de ocho inmunógenos (nuevos derivados de morfina y dos formas diferentes de conjugados) y la tecnología de preparación de anticuerpos a partir de una biblioteca de fagos. El mAB M86 reconoce con alta afinidad a morfina, codeína y heroína (Matsukizono et al., 2013).

### Estudios para la generación de conocimiento centrados en análisis estructurales

Tres artículos además del artículo de Glasel, en esta revisión, estudiaron las interacciones entre los complejos de unión antígeno-anticuerpo de los mABs que reconocen a morfina. El grupo de Droupadi analizó los complejos moleculares de unión de cuatro mABs antimorfina con ligandos opioides y destacaron que los aminoácidos de triptófano localizados en el sitio de unión de los mABs participan en la formación del complejo mAB-ligando (Droupadi et al., 1994). Pozharski estudió la estructura cristalizada del fragmento Fab del mAB antimorfina 9B1 complejado con morfina, reportada en la base de datos Protein Data Bank (1NBV), y las evaluaciones *in silico* mostraron alta afinidad ( $K_a \sim 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ ) y especificidad por morfina (Pozharski et al., 2004). Trofimov y su grupo de investigación generaron dos mABs, el 6G1 y el 3K11, capaces de inhibir la acción de la morfina libre como lo hace la antagonista naloxona en cultivos de linfocitos humanos. Determinaron la afinidad de los mABs con estudios de modelaje computacional de la estructura parcial de los mABs y sus complejos con antígenos, a partir de las secuencias de aminoácidos y datos experimentales de la interacción de los mABs con la morfina obtenidos por resonancia de superficie de plasmón y por ensayos de ELISA. Estos mABs se reportaron inicialmente por Berzina y colaboradores en 2016, en un artículo en ruso cuyo resumen está en inglés. Los mABs 6G1 y 3K11 reconocen diferentes fragmentos de la molécula de morfina y son epítomos específicos, lo que les confiere diversas propiedades de afinidad dado que existen diferencias importantes en la constitución química de las regiones determinantes de complementariedad de los dominios variables. 3K11 se asocia tres veces más rápido e interactúa más eficientemente con morfina que

el 6G1, lo que se atribuye a que los inmunógenos utilizados para su generación son dos conjugados diferentes (M3-BSA y M6-BSA) en los que la morfina se expuso de maneras diferentes (Trofimov et al., 2020).

## DISCUSIÓN

Desde 1983, diferentes grupos de investigación produjeron y caracterizaron 61 mABs específicos para identificar morfina publicados en 18 artículos estudiados en esta revisión. Cada grupo seleccionó los más adecuados en función de sus características de afinidad y especificidad para acoplarlos como reactivos biológicos en pruebas diagnósticas inmunológicas cada vez más sensibles y de fácil implementación para el diagnóstico clínico y la vigilancia del uso de heroína y morfina en la población.

La morfina es el analito blanco para vigilar el abuso de heroína en fluidos biológicos, dado que la heroína tiene una vida media muy corta (aproximadamente 2 - 4 minutos) en torrente sanguíneo y es metabolizada rápidamente a 6-MAM, morfina, M6G y M3G. La morfina y la M6G son detectables en la orina durante varios días después de la ingestión de opiáceos, más aún, la morfina se excreta sin metabolizar y también es el principal producto metabólico de la codeína.

La mayoría de los mABs identificaron a morfina con alta afinidad en el rango de concentraciones nanomolares y también reconocieron en diferente proporción a sustancias de importancia clínica con estructura química relacionada con la morfina y a sustancias no estrechamente relacionadas, como la cafeína.

Se exige que los mABs no reconozcan a los fármacos de uso común como analgésicos, antitusivos y antidiarreicos (codeína, etilmorfina, nalorfina y oxicodona) para evitar resultados falsos positivos en pacientes con tratamientos con estos fármacos, y que tampoco reconozcan a los fármacos que se emplean en el tratamiento del abuso e intoxicación aguda por opioides, como metadona, naloxona y naltrexona.

Los investigadores evaluaron la afinidad o fuerza de unión entre el hapteno y el anticuerpo en un solo sitio antigénico de morfina por los mABs, lo que determina las constantes de afinidad ( $K_a$ ) para 38 mABs y de disociación ( $K_D$ ) para 14 mABs. La Tabla 1 mostró que los mABs con mayor afinidad en función de la  $K_a$  son el 131,5,13, el antimorphine y el 9B1, con valores de  $47 \times 10^9$ ,  $2.8 \times 10^9$  y  $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente; y en función de la  $K_D$ , el mAB anti-MOR es el de mayor afinidad, con un valor de  $0,23 \times 10^{-9} \text{ M}$ . Los demás mABs enumerados también son de alta afinidad dado que los valores de  $K_D$  están en el rango nanomolar ( $1 - 61 \times 10^{-9} \text{ M}$ ), pero el mAB 6MAM-219 mostró un valor de  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , siendo el de

menor afinidad entre todos. En resumen, todos los mABs mostraron alta afinidad por la morfina y en las pruebas de diagnóstico donde se acoplaron los mABs, tanto en las formas clásicas de mABs como los anticuerpos sintéticos. Se evaluaron los valores de límites de detección o rango de sensibilidad para los métodos de diagnóstico implementados con los mABs enumerados en la Tabla 2, donde se muestra que el método de RIA es el más sensible dado que identifica a 0,0285 ng/ml de morfina en PBS y los diferentes métodos de ELISA son altamente sensibles, pues su rango de detección es de 0.1 a 200 ng/ml en PBS, muestras de suero y orina. Con el método de BIAcore aumentó la sensibilidad a 0,000381 ng/ml en PBS acoplado un scFv derivado de un mAB.

Todas las pruebas diseñadas cumplieron con los valores de referencia establecidos por la FDA: 2000 ng/ml para morfina y 10 ng/ml para 6-MAM, por ello son viables para emplearlos en diagnóstico clínico. Así mismo, superaron el punto de corte establecido por la FDA, 2 ug/ml para opiáceos y 10 ng/ml para 6-MAM, por lo que son adecuados en el análisis de muestras biológicas para identificar morfina o sus metabolitos.

El mAB Anti-MOR de Cao mostró las mejores características de todos los mABs evaluados: baja reacción cruzada por todas las sustancias evaluadas (codeína, heroína, 6-MAM, 3-MAM, efedrina, cocaína, y ketamina). No tiene reacción cruzada por las sustancias con estructura estrechamente relacionada con la morfina con un sustituyente, como codeína, 6-MAM y 3-MAM, y con dos sustituyentes, como heroína, y no identifica sustancias con menor relación estructural, como efedrina, cocaína y ketamina (<0,05% - 8,8). Se predice que no reconocerá a los antagonistas opioides como naloxona y naltrexona, y buprenorfina (agonista parcial cuya estructura química es muy parecida a la morfina, pero con sustituyentes mayores) ni metadona, opioide sintético con mayor diferencia estructural, pero es necesario confirmarlo experimentalmente dada la importancia de su empleo en tratamiento con estas sustancias. Para este mAB, el límite de detección fue de 1 ng/ml en el inmunoensayo fluorescente para muestras de orina, pero no determinaron constantes de afinidad que permitan compararlo con los otros mABs específicos.

El estudio de los complejos de unión entre los haptenos y los mABs mostró la diversidad estructural de los mABs identificando a los aminoácidos estrechamente involucrados en las interacciones del reconocimiento antigénico y responsables de las propiedades de afinidad específica para cada anticuerpo estudiado.

El conocimiento adquirido del estudio de los mecanismos moleculares implicados en las interacciones antígeno-anticuerpo entre la morfina y los mABs es de utilidad para mejorar las propiedades de unión y optimizar los métodos de diagnóstico. A partir de esta información

se han diseñado exitosamente anticuerpos sintéticos con propiedades mejoradas y/o adecuadas para aplicaciones específicas.

## CONCLUSIONES

En conclusión, este trabajo reúne la información disponible sobre la generación de mABs para morfina y sus metabolitos, desde los trabajos pioneros hasta los actuales, para conocer los alcances de su implementación en pruebas de diagnóstico en función de las propiedades individuales de cada mAB. A la fecha, los grupos de investigación han implementado inmunoensayos reproducibles, sensibles y específicos, posibilitando su empleo para el análisis de volúmenes pequeños de uno a cinco microlitros de muestras biológicas de saliva, sudor o lágrimas, sin interferencia del pH o la consistencia de la muestra, algunos sin preparación previa de las muestras. Cada vez se requiere una menor cantidad de antígeno en los ensayos y se ha logrado la ejecución de las pruebas en un solo paso con resultados comparables en 96.8% con las técnicas enzimáticas múltiples y cromatografía de alta resolución, que pueden adaptarse a diferentes métodos de detección y análisis rutinarios en la clínica, con métodos de identificación colorimétricos, fluorescentes o a simple vista.

La información obtenida a partir de los estudios de estructura molecular, en conjunto con los avances en las metodologías biotecnológicas, ha permitido el desarrollo de mABs recombinantes con características mejoradas, mayor afinidad y especificidad de reconocimiento por la morfina y sustancias relacionadas. Además, posibilita el diseño de mABs que identifiquen más de una sustancia de abuso y/o a otras moléculas de interés clínico en una misma prueba. Lo anterior permite reducir costos y tiempo de ejecución en el análisis de muestras para implementarlos como terapéuticos en el abuso de opioides, previos ensayos clínicos pertinentes. La especificidad y afinidad de los mABs generados depende en gran medida de las estrategias empleadas en su diseño, específicamente en la preparación de los inmunógenos, la presentación de las sustancias a medir como analitos y hacia las que se dirige el reconocimiento de los mABs, de acuerdo con el interés de cada grupo de investigación.

## FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente investigación fue financiada por la Fundación Gonzalo Río Arronte, IAP (SA/285) y por el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INP-2040). Las opiniones, hallazgos y conclusiones aquí presentadas son las de los autores y no necesariamente reflejan las de los patrocinadores.

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Declaramos que no existen conflictos de interés por parte de los autores.

## REFERENCIAS

- Berzina, A. G., Gamaleya, N. B., Sergeeva, V. E., Trofimov, A. V., Krotov, G., & Ul'yanova, L. I. (2016). Production of polyclonal and monoclonal antibodies against two morphine derivatives. *Voprosy Narkologii*, 11(12), 39-54. (En ruso) <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=30024412>
- Brennan, J., Dillon, P., & O'Kennedy, R. (2003). Production, purification and characterization of genetically derived scFv and bifunctional antibody fragments capable of detecting illicit drug residues. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 25, 786(1-2), 327-42. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00807-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00807-3)
- Cao, J., Chen, X. Y., & Zhao, W. R. (2019). Determination of Morphine in Human Urine by the Novel Competitive Fluorescence Immunoassay. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, Article ID 7826090. <https://doi.org/10.1155/2019/7826090>
- Dehghannezhad, A., Paknejad, M., Rasaei, M. J., Omidfar, K., Seyyed-Ebrahimi, S. S. & Ghahremani, H. (2012). Development of a Nanogold-Based Immunochromatographic Assay for Detection of Morphine in Urine Using the Amor-HK16 Monoclonal Antibody. *Hybridoma*, 31(6), 411-116. <https://doi.org/10.1089/hyb.2012.0059>
- Dillon, P. P., Daly, S. J., Manning, B. M., & O'Kennedy, R. (2003). Immunoassay for the determination of morphine-3-glucuronide using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(2-3), 217-227. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00182-3](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00182-3)
- Denis-Oliveira, R., J. (2019) Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 61, 128-140. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2018.12.005>
- Droupadi, P. R., Meyers, E. A., & Linthicum, D. S. (1994). Spectroscopic evidence for charge-transfer complexation in monoclonal antibodies that bind opiates. *Journal of Protein Chemistry*, 13(3), 297-306. <https://doi.org/10.1007/bf01901562>
- Eldefrawi, M. E., Azer, N. L., Nath, N., Anis, N. A., Bangalore, M. S., O'Connell, K. P., Schwartz, R. P. & Wright, J. (2000). A sensitive solid-phase fluoroimmunoassay for detection of opiates in urine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 87(1), 25-35. <https://doi.org/10.1385/abab:87:1:25>
- Fleiz-Bautista, C., Domínguez-García, M., Villatoro-Velázquez, J. A., Vázquez-Quiroz, F., Zafra-Mora, E., Sánchez-Ramos, R., Resendiz-Escobar, E., Bustos-Gamiño, M., & Medina-Mora, M. E. (2019). *Cuqueando la Chiva: Contextos del consumo de heroína en la frontera norte de México...* Ciudad de México, México: INPRFM.
- Glasel, J. A., Braudbury, W. M., & Venn, R. F. (1983). Properties of murine anti-morphine antibodies. *Molecular Immunology*, 20(12), 1419-1422. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(83\)90175-x](https://doi.org/10.1016/0161-5890(83)90175-x)
- Kashanian, S., Shams, A., Ghahremani, H., & Paknejad, M. (2015) Preparation and Characterization of a Monoclonal Antibody Against Morphine. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 34(4), 270-274. <https://doi.org/10.1089/mab.2014.0098>
- Khademi, H., Kamangar, F., Brennan, P., & Malekzadeh, R. (2016). Opioid therapy and its side effects: A Review. *Archives of Iranian Medicine*, 19(12), 870-876. <http://www.aimjournal.ir/Article/1105>
- Matsukizono, M., Kamegawa, M., Tanaka, K., Kohra, S., Arizono, K., Hamazoe, Y., & Sugimura, K. (2013). Characterization of a Single Chain Fv Antibody that Reacts with Free Morphine. *Antibodies*, 2(1), 93-112. <https://doi.org/10.3390/antib2010093>
- Moghaddam, A., Borgen, T., Stacy, J., Kausmally, L., Simonsen, B., Marvik, O. J., Brekke, O. H. & Braunagel, M. (2003). Identification of scFv antibody fragments that specifically recognize the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *Journal of Immunological Methods*, 280(1-2), 139-155. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00109-1)
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., et al. (2021) The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, 372, n71. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
- Paknejad, M. (2010). Monoclonal Antibody Amor-HK16 Against Morphine. *Hybridoma*, 29(1), 78. <https://doi.org/10.1089/hyb.2009.0083>
- Pozharski, E., Wilson, M. A., Hewagama, A., Shanafelt, A. B, Petsko, G., & Ringe, D. (2004). Anchoring a Cationic Ligand: The Structure of the Fab Fragment of the Anti-morphine Antibody 9B1 and its Complex with Morphine. *Journal of Molecular Biology*, 337(3), 691-697. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.12.084>
- Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Madani, R., Rahbarizadeh, M. H., & Omidfar, K. (2000). Preparation and Characterization of Specific and High-Affinity Monoclonal Antibodies Against Morphine. *Hybridoma*, 19(5), 413-417. <https://doi.org/10.1089/02724570050198938>
- Sawada, J., Janejai, N., Nagamatsu, K., & Terao, T. (1988). Production and characterization of high-affinity monoclonal antibodies against morphine. *Molecular Immunology*, 25(9), 937-943. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(88\)90133-2](https://doi.org/10.1016/0161-5890(88)90133-2)
- Townsend, E. A., & Banks, M. L. (2020). Preclinical Evaluation of Vaccines to Treat Opioid Use Disorders: How Close are We to a Clinically Viable Therapeutic? *CNS Drugs*, 34, 449-461. <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00722-8>
- Trofimov, A. V., Sokolov, A. V., Rak, A. Y., Ischenko, A. M., Kudling, T. V., Vakhrushev, A. V., & Gorbunov, A. A. (2020) Epitope specificity of two anti-morphine monoclonal antibodies: In vitro and in silico studies. *Journal of Molecular Recognition*, 33(9), e2845. <https://doi.org/10.1002/jmr.2845>
- Usagawa, T., Itoh, Y., Hifumi, E., Takeyasu, A., Nakahara, Y., & Uda, T. (1993) Characterization of morphine-specific monoclonal antibodies showing minimal cross-reactivity with codeine. *Journal of Immunological Methods*, 157(1-2), 143-148. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90080-q](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90080-q)
- Volkow, N. D., Jones, E. B., Einstein, E. B., & Wargo, E. M. (2019) Prevention and Treatment of Opioid Misuse and Addiction: A Re-

view. *JAMA Psychiatry*, 76(2), 208-216. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2018.3126>

World Drug Report 2021 (United Nations publication, Sales No. E.21.XI.8).

Yang, T. B., Zhong, P., Nie, J. L., Li, J. S., Qu, L. N., Li, Y. H., & Kan, G. H. (2002). Preparation and Identification of Specific and High-Affinity Monoclonal Antibodies Against Morphine. *Hybridoma and Hybridomics*, 21(3), 197-201. <https://doi.org/10.1089/153685902760173926>