

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 751**

21 Número de solicitud: 201531661

51 Int. Cl.:

C07D 451/00 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A01N 43/46 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

17.11.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.05.2017

68 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

06.07.2017

Fecha de la concesión:

03.05.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

10.05.2018

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ABAD FUENTES, Antonio;
MERCADER BADIA, Josep Vicent;
ABAD SOMOVILLA, Antonio;
AGULLÓ BLANES, Consuelo y
QUIÑONES REYES, Guillermo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PREPARACIÓN DE BIOCONJUGADOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE ANATOXINA-A**

ES 2 612 751 B1

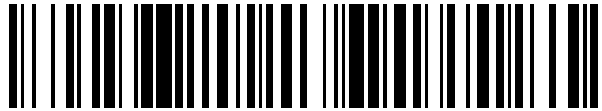
Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 751**

21 Número de solicitud: 201531661

57 Resúmen:

Preparación de bioconjugados y anticuerpos para la inmunodetección de anatoxina-a.

La presente invención se refiere a bioconjugados y derivados marcados de anatoxina-a, por posiciones diferentes de la molécula, adecuados para la producción de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad para anatoxina-a. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de bioconjugados de anatoxina-a y de derivados marcados de anatoxina-a como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere a métodos de análisis, concentración y extracción de anatoxina-a utilizando los anticuerpos obtenidos, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son bioconjugados o derivados marcados. Esta invención también proporciona un kit para analizar anatoxina-a que comprende anticuerpos frente a esta cianotoxina, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son bioconjugados o derivados marcados de la anatoxina-a.

ES 2 612 751 B1

PREPARACIÓN DE BIOCONJUGADOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE ANATOXINA-A

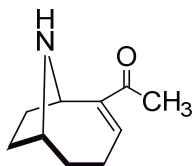
DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a bioconjugados y derivados marcados de anatoxina-a, por posiciones diferentes de la molécula, adecuados para la producción de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad para anatoxina-a. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de bioconjugados de anatoxina-a y de derivados marcados de anatoxina-a como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere a métodos de análisis, concentración y extracción de anatoxina-a utilizando los anticuerpos obtenidos, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son bioconjugados o derivados marcados. Esta invención también proporciona un kit para analizar anatoxina-a que comprende anticuerpos frente a esta cianotoxina, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son bioconjugados o derivados marcados de la anatoxina-a.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

Las biotoxinas son un tipo de contaminante cuya presencia en alimentos, aguas y piensos representa un verdadero problema para la salud humana y el bienestar animal, ocasionando importantes pérdidas económicas a los sectores agroalimentario, agropecuario y piscícola, y pudiendo afectar gravemente a la salubridad del agua potable. Entre las biotoxinas más relevantes debido a su toxicidad y prevalencia destacan las producidas por cianobacterias, especialmente la microcistina-LR, la cilindrospermopsina y la anatoxina-a.

La anatoxina-a (2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno) es una amina secundaria bicíclica que incorpora un resto de metilcarbonilo alfa-beta insaturado.



Anatoxina- a

Esta toxina es producida por diferentes especies de cianobacterias pertenecientes fundamentalmente a los géneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*,

Planktothrix y *Cylindrospermum*. Bajo ciertas condiciones ambientales, estos microorganismos procariotas son capaces de proliferar de manera exacerbada, dando lugar a eclosiones repentinas, conocidas en la literatura científica como floraciones masivas de algas [Osswald et al., *Environ. Int.*, **2007**, 33, 1070–1089]. Estos afloramientos o *blooms*, en terminología anglosajona, se consideran actualmente más frecuentes e intensos que antaño debido a la eutrofización consecuencia de la actividad humana y al calentamiento global [Taranu et al., *Ecol. Lett.*, **2015**, 18, 375–384]. Las principales vías de exposición de la población humana y animal a la anatoxina-a son a través de agua contaminada, ya sea por ingesta intencionada (agua potable procedente de fuentes superficiales) o accidental (usos recreacionales y deportivos), y a través del consumo de suplementos dietéticos derivados de algas que no siempre cuentan con los controles adecuados y que pueden por tanto contener especies no deseadas de cianobacterias productoras de toxinas [Gutiérrez-Praena et al., *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 53, 139–152]. Una ruta de exposición que ha adquirido mayor relevancia en los últimos años y que por tanto constituye un riesgo emergente es a través del consumo de pescado y moluscos bivalvos, procedentes tanto de la pesca tradicional como de piscicultura, que se han desarrollado en masas de agua afectadas por plagas de cianobacterias y que por tanto han estado expuestos a estas biotoxinas [Ibelings et al., *Environ. Pollut.*, **2007**, 150, 177–192; Miller et al., *PLOS ONE*, **2010**, 5, e12576;].

El primer caso confirmado de intoxicación por anatoxina-a se produjo en Canadá en los años 60, donde causó la muerte de ganado vacuno, y en aquel momento, debido a su elevada toxicidad, se la denominó como *Very Fast Death Factor* – inyectada intraperitonealmente en ratones éstos morían en menos de 5 minutos [Aráoz et al., *Toxicon*, **2010**, 56, 813–828; Osswald et al., *Environ. Int.*, **2007**, 33, 1070–1089]. Su elevada potencia como neurotoxina (LD₅₀ intraperitoneal en ratones: 250 µg/kg) se debe a que es un agonista de la acetilcolina, uniéndose de forma irreversible al receptor nicotínico de acetilcolina a nivel neuromuscular, lo que bloquea el canal de sodio e impide la repolarización de la membrana, causando sobreestimulación muscular que provoca convulsiones, parálisis y finalmente la muerte por parada cardiorrespiratoria. La anatoxina-a es una de las cianotoxinas más frecuentemente detectadas, lo que unido a criterios toxicológicos y epidemiológicos ha llevado a la *US Environmental Protection Agency* (USEPA) a considerarla un contaminante prioritario, y a promover estudios adicionales que permitan evaluar los riesgos y establecer regulaciones y directrices [Hudnell y Dortch, En *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms* (Chapter 2), Ed. H.K. Hudnell, Springer, NY, USA. **2008**]. En esta misma línea, la

EFSA aconsejó recientemente considerar la posible presencia de cianotoxinas en alimentos como un riesgo emergente, y publicó una convocatoria para la realización de un informe bibliográfico sobre este tema (OC/EFSA/SCER/2014/04).

- 5 Se han registrado gran cantidad de casos fatales debido a intoxicación por anatoxina-a en animales domésticos, ganado y fauna salvaje como consecuencia de la ingesta de aguas contaminadas, donde se han llegado a registrar concentraciones superiores a 1 mg/L, un valor al menos 100 veces superior al recomendado por diferentes organismos oficiales [Trainer et al., *Toxins*, **2015**, 7, 1206–1234]. En muchas zonas el
10 problema es recurrente y se repite cada año.

Como corresponde a un contaminante tan ampliamente distribuido y relevante, son varios los métodos desarrollados para su detección [Dimitrakopoulos et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397, 2245–2252; Lemoine et al., *Toxicon*, **2013**, 61, 164–174;
15 Roy-Lachapelle et al., *Talanta*, **2015**, 132, 836–844], si bien la técnica de HPLC-MS/MS es sin duda el procedimiento más sensible y más ampliamente aceptado, y el utilizado por la USEPA como método oficial. Existe no obstante un amplio consenso sobre la necesidad de obtener anticuerpos frente a anatoxina-a y de desarrollar métodos analíticos rápidos y fiables que permitan gestionar eficientemente
20 las crisis que se producen, evitando daños sobre la salud humana y los ecosistemas. Ya en 2005, en un simposio sobre cianotoxinas, se identificó como línea de investigación prioritaria el desarrollo de un ELISA para anatoxina-a, objetivo que sigue estando vigente 10 años después [Pegram y Nichols, En *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms* (Chapter 15), Ed. H.K. Hudnell, Springer, NY, USA. **2008**]. Lo más cercano a
25 un método inmunoanalítico desarrollado hasta la fecha es un ensayo basado en la utilización del receptor de acetilcolina procedente de membranas de electrocitos de la raya eléctrica (*Torpedo sp.*) [Aráoz et al., *Toxicon*, **2010**, 56, 813–828]. Un kit basado en este procedimiento está comercialmente disponible (Abraxis LLC, Warminster, USA), si bien su sensibilidad no parece suficiente, y está lejos de las exhibidas por
30 ELISAs comerciales para otras cianotoxinas. El único intento documentado de sintetizar un análogo funcionalizado de la anatoxina-a con vistas a generar anticuerpos fue publicado en 2009, aunque los autores no demostraron haber conseguido el objetivo perseguido, ni tampoco dicho trabajo tuvo continuidad posteriormente [Marc et al., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 4554–4557]. Los métodos inmunoanalíticos se basan
35 en la unión selectiva, reversible y no covalente entre la sustancia a detectar (analito) y un anticuerpo que la reconoce con una elevada afinidad. Dependiendo de la finalidad analítica, los anticuerpos se pueden adaptar a diferentes formatos, tales como

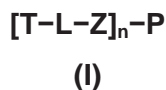
columnas de inmutoafinidad, ensayos de flujo lateral y tiras inmutorreactivas, biosensores, *microarrays*, y muy especialmente ensayos tipo ELISA.

Hasta la fecha no se ha descrito la preparaci3n de anticuerpos capaces de reconocer a la anatoxina-a, por lo que tampoco se han desarrollado m3todos inmutoanal3ticos de cualquier tipo que permitan la determinaci3n, detecci3n, concentraci3n o extracci3n de anatoxina-a empleando anticuerpos. Existe por tanto una necesidad, en particular de la industria alimentaria, agr3cola, cl3nica y/o medioambiental, de desarrollar m3todos anal3ticos que comprendan al menos un anticuerpo para anatoxina-a, preferentemente mediante la utilizaci3n de un kit.

DESCRIPCI3N DE LA INVENCION

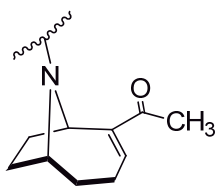
La presente invenci3n proporciona bioconjugados y derivados marcados de anatoxina-a, y el uso de los bioconjugados para la obtenci3n de anticuerpos para anatoxina-a.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invenci3n se refiere a un bioconjugado de f3rmula general (I):

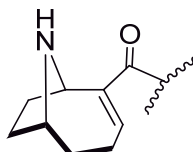


donde:

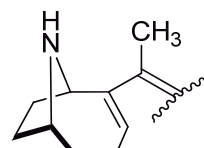
T se selecciona del grupo que consiste en R-I, R-II y R-III;



R-I



R-II



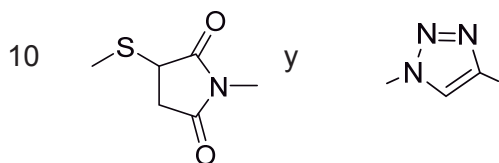
R-III

L es una cadena hidrocarbonada de 0 a 40 3tomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende la sustituci3n de entre 0 y 10 3tomos de carbono por hetero3tomos, que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N; preferiblemente L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 3tomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 hetero3tomos seleccionados del grupo que consiste en O y N, y

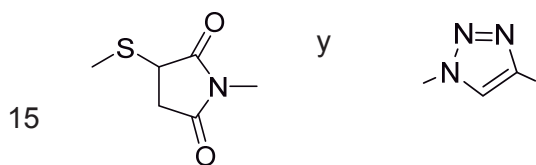
más preferiblemente **L** es una cadena hidrocarbonada lineal saturada de 1 a 10 átomos de carbono y opcionalmente la cadena hidrocarbonada comprende entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; y

Z es un grupo funcional seleccionado entre:

- 5 $-(C=O)NH-$, $-NH(C=O)-$, $-(C=O)S-$, $-S(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-O(C=O)-$, $-O(C=O)O-$,
 $-O(S=O)O-$, $-O(SO_2)O-$, $-NH(S=O)O-$, $-O(S=O)NH-$, $-NH(SO_2)O-$, $-O(SO_2)NH-$,
 $-(SO_2)NH-$, $-NH(SO_2)-$, $-O(C=O)NH-$, $-NH(C=O)O-$, $-NH(C=O)NH-$,
 $-NH(C=S)NH-$, $-NH-$, $-N(\text{alquilo})-$, $-S-$, $-S-S-$, $-NH-NH-$, $-N=C-$, $-C=N-$,
 $-NH(C=NH)-$, $-N=N-$, $-O-$, $-CH=CH-$,



En una realización preferida, **Z** se selecciona del grupo que consiste en $-(C=O)NH-$, $-NH(C=O)-$, $-O(C=O)NH-$, $-NH(C=O)O-$, $-NH(C=O)NH-$, $-NH-$, $-S-$,



Más preferentemente, **Z** es $-(C=O)NH-$.

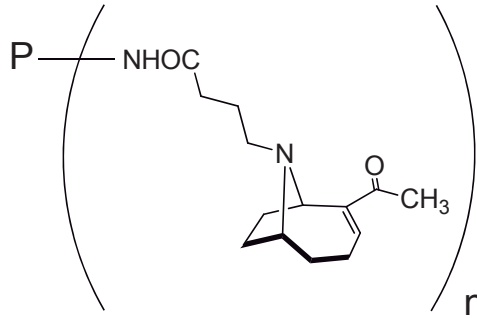
P es un péptido o polipéptido, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 daltons. El péptido o polipéptido **P** puede estar o no unido, mediante interacción
 20 covalente, electrostática o de otro tipo, a un soporte. Dicho soporte puede ser un polímero sintético o no, o estar compuesto por nanomateriales como nanotubos de carbono, zeolitas o sílice mesoporosa.

Según otra realización preferida de la presente invención, el bioconjugado de fórmula
 (I) descrito en esta solicitud de patente se caracteriza porque **P** se selecciona del
 25 grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, beta-galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa. Más preferiblemente **P** es peroxidasa o albúmina, que puede ser albúmina de huevo o albúmina sérica; y

n es un número con un valor entre 1 y 500; preferiblemente **n** es un valor entre 1 y 100.

El valor de **n** indica el grado de conjugación, es decir, la relación molar entre la fracción derivada del compuesto de fórmula **T-L-Z** y **P**, en el bioconjugado de fórmula **(I)** resultante.

Según otra realización preferida de la presente invención, el bioconjugado de fórmula **(I)** es un bioconjugado de fórmula **(Ia)**

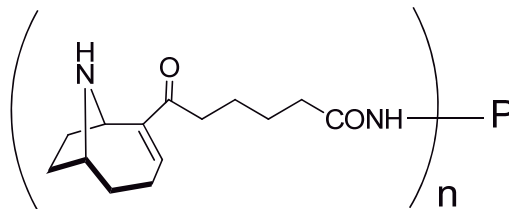


(Ia)

donde:

P y **n** se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina o peroxidasa y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Según otra realización preferida, el bioconjugado de fórmula **(I)** es un bioconjugado de fórmula **(Ib)**

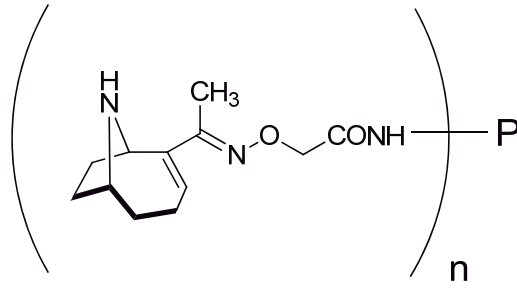


(Ib)

15 donde:

P y **n** se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina o peroxidasa y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Según otra realización preferida, el bioconjugado de fórmula **(I)** es un bioconjugado de fórmula **(Ic)**



(Ic)

donde:

P y **n** se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina o peroxidasa y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

El bioconjugado de formula (I) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un derivado funcionalizado (hapteno) de la anatoxina-a con **P**, un polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor a 2000 daltons, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

10

En otra realización de la presente invención, cuando el material portador es un marcador no isotópico detectable, el derivado es un compuesto de formula (II):



(II)

15

donde **T**, **L** y **Z** tienen el mismo significado definido anteriormente para el bioconjugado de formula (I);

20 **Q** es un marcador no isotópico detectable; y

m es un número con un valor entre 1 y 1000; preferiblemente **m** es un valor seleccionado entre 1 y 100.

25 En la presente invención se entiende por “marcador” cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica analítica. En la presente invención, **Q** identifica un fragmento o una molécula química detectora, marcadora o trazadora no isotópica.

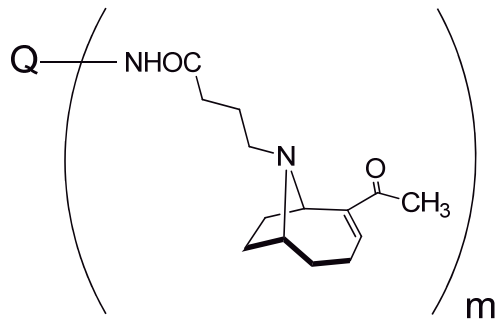
En una realización preferida, **Q** es una enzima, biotina, un compuesto luminiscente, un fluoróforo, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta, micro o nanopartículas u otros. Preferentemente, **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, fosfatasa alcalina, biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados,

5 un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio, nanopartículas cuánticas (en inglés *quantum dots*), y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

10 Este compuesto de fórmula (II) puede utilizarse con un anticuerpo de anatoxina-a para determinar o detectar esta cianotoxina en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo.

Según una realización preferida, el derivado de fórmula (II) es un derivado de fórmula

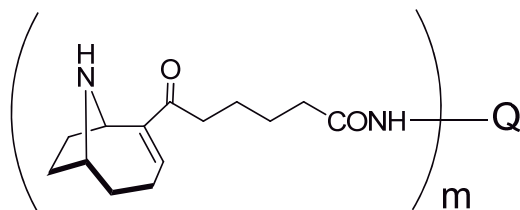
15 (IIa)



(IIa)

donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

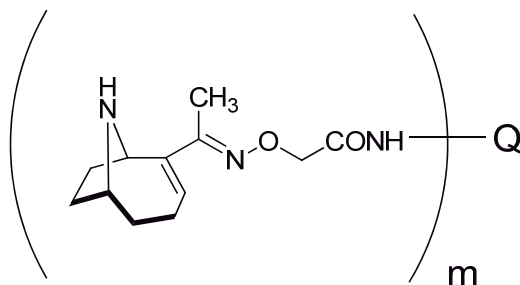
20 Según otra realización también más preferida, el derivado de fórmula (II) es un derivado de fórmula (IIb)



(IIb)

donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

Según otra realización también más preferida, el derivado de fórmula (II) es un derivado de fórmula (IIc)



5

(IIc)

donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

El derivado marcado de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un derivado funcionalizado (hapteno) de la anatoxina-a con **Q**, un marcador no isotópico, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

El bioconjugado de fórmula (I) de la presente invención puede utilizarse para la producción de anticuerpos, o junto con un anticuerpo de anatoxina-a para determinar o detectar esta cianotoxina en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo. Además, los derivados marcados de fórmula (II) pueden utilizarse junto con un anticuerpo de anatoxina-a para determinar o detectar esta cianotoxina en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo.

20

Para obtener anticuerpos frente a anatoxina-a se han preparado derivados funcionalizados de dicha cianotoxina (haptenos), es decir, análogos estructurales de anatoxina-a que incorporan un grupo funcional susceptible de ser utilizado para la conjugación a un portador **P** o marcador **Q**. Este grupo funcional está separado del esqueleto de la molécula de anatoxina-a por un espaciador **L**. La posición de incorporación del grupo funcional a la estructura de anatoxina-a para la conjugación no es un aspecto obvio y puede ser determinante para la viabilidad de los bioconjugados de fórmula (I) como inductores de la producción de anticuerpos de afinidad y selectividad adecuadas frente a anatoxina-a e incluso para la viabilidad de los

25

bioconjugados de fórmula (I) o de derivados marcados de fórmula (II) para actuar como moléculas competidoras que permitan el desarrollo de un inmunoensayo sensible y específico para dicha cianotoxina.

5 En el contexto de esta invención el término “anticuerpo” se refiere a la inmunoglobulina que el animal o una célula híbrida (como un hibridoma) sintetiza, de forma específica contra el inmunógeno de la invención (bioconjugado de la invención).

Por tanto, un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo (a partir de ahora anticuerpo de la invención) generado en respuesta a un bioconjugado de la invención, en particular al bioconjugado de fórmula (I). Más preferiblemente los anticuerpos son generados en respuesta al bioconjugado de fórmula (Ia), (Ib) o (Ic), más preferiblemente al bioconjugado de fórmula (Ib).

El procedimiento de obtención de los anticuerpos de la invención a partir de bioconjugados de la invención se puede llevar a cabo por métodos de inmunización ampliamente conocidos en la técnica. Los anticuerpos generados a partir de un bioconjugado de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos de la invención tienen alta afinidad y especificidad hacia anatoxina-a

Otro aspecto de presente invención se refiere a un antisuero (a partir de ahora antisuero de la invención) que comprende los anticuerpos de la invención.

El término “antisuero” se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el contexto de la presente invención, el inmunógeno es el bioconjugado de la invención y el antisuero comprende anticuerpos específicos generados frente al bioconjugado de la invención, los anticuerpos de la invención.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método de análisis *in vitro* de anatoxina-a en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- 30
- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo o el antisuero de la invención;
 - b) incubar la muestra y el anticuerpo (o el antisuero) de la etapa (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica; y
 - c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa
- 35 (b).

El método de la presente invención permite la determinación cuantitativa o análisis cualitativo del contenido de la cianotoxina anatoxina-a en una muestra. Asimismo, el método de la presente invención permite analizar el contenido de anatoxina-a en
5 diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de alimentos, muestras medioambientales tales como agua, suelo o superficie, y muestras biológicas aisladas tales como orina. Preferentemente, la presente invención proporciona un método de análisis *in vitro* de anatoxina-a en agua.

10 Según una realización preferida, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un bioconjugado de formula (I) o un derivado marcado de fórmula (II). Preferentemente, el inmunoensayo competitivo es de tipo ELISA.

15 El término inmunoensayo hace referencia a un ensayo analítico en el que ocurre una reacción inmunoquímica para la detección o cuantificación de un analito. Los inmunoensayos competitivos son aquéllos en los que el analito compite con otra molécula por la unión con el anticuerpo.

20 El término “antígeno” en esta solicitud de patente se refiere a una molécula capaz de interaccionar específicamente con un anticuerpo. La interacción o reacción inmunoquímica consiste en la unión específica y no covalente entre un anticuerpo y un antígeno, pudiendo ser éste el analito o un antígeno de ensayo.

25 En la presente memoria el término “antígeno de ensayo”, “antígeno enzimático” o “trazador” se refiere a un bioconjugado de formula (I) o a un derivado marcado de formula (II) que se utiliza en el ensayo competitivo.

Un quinto aspecto de la presente invención también se refiere a un kit de detección de
30 anatoxina-a que utiliza al menos un anticuerpo de la invención. Adicionalmente, el kit de detección de anatoxina-a puede comprender un bioconjugado de formula (I) o un derivado marcado de formula (II) tal como se describen en la presente solicitud de patente.

35

Un sexto aspecto de la presente invención también se refiere a un método de purificación y/o concentración de anatoxina-a de una muestra consistente en inmovilizar al menos un anticuerpo de la invención sobre un soporte cualquiera y hacer pasar una muestra a través de dicho soporte para que retenga la anatoxina-a presente en dicha muestra. La elución posterior de la anatoxina-a retenida en el soporte por métodos ampliamente conocidos en la técnica (cambio de pH, modificación de la fuerza iónica, utilización de agentes caiotrópicos) permitirá su purificación y/o concentración, en un sistema conocido como cromatografía de inmunoafinidad.

10 Los términos "inmunógeno" e "inmunogénico" tal como se utilizan en la presente invención se refieren a una sustancia que es reconocida como extraña al organismo vivo y por lo tanto es capaz de producir o de generar una respuesta inmune en un huésped. En la presente invención el inmunógeno es un bioconjugado de fórmula (I).

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

20

A continuación se ilustra con algunos ejemplos y figuras la forma en que puede efectuarse la preparación de varios derivados funcionalizados de anatoxina-a (haptenos) y los correspondientes bioconjugados de fórmula (I), que no pretenden que sean limitativos de la presente invención, y que sirven para mostrar no sólo la forma en que puede efectuarse la preparación de los mismos sino también la importancia que puede tener la naturaleza estructural del bioconjugado de fórmula (I) para la producción de anticuerpos de afinidad adecuada hacia el analito, aptos para el desarrollo de un eficaz método inmunoanalítico.

25

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Fig. 1. Estructura de la anatoxina-a.

Fig. 2. Esquema de la síntesis del hapteno NHS-ANA-1.

Fig. 3. Esquema de la síntesis del hapteno NHS-ANA-2.

35

Fig. 4. Esquema de la síntesis del hapteno NHS-ANA-3.

Fig. 5. Esquema de la preparación de un bioconjugado de fórmula (I) a partir del correspondiente derivado funcionalizado (hapteno) de anatoxina-a.

Fig. 6. Curva estándar para anatoxina-a con los anticuerpos monoclonales obtenidos en el formato de ELISA competitivo indirecto.

5 **Fig. 7.** Curva estándar para anatoxina-a con los anticuerpos monoclonales obtenidos en el formato de ELISA competitivo directo.

Fig. 8. Enantioespecificidad de los anticuerpos monoclonales frente a anatoxina-a

EJEMPLOS

10

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de los bioconjugados de fórmula (I) para la obtención de anticuerpos frente a anatoxina-a y el desarrollo de un inmunoensayo de elevada sensibilidad para la misma. Los números en negrita hacen referencia a la correspondiente estructura que se muestra en los esquemas. Estos ejemplos se presentan a modo de demostración pero de ningún modo pueden suponer un límite a la invención.

15

1. Preparación de bioconjugados de fórmula (I)

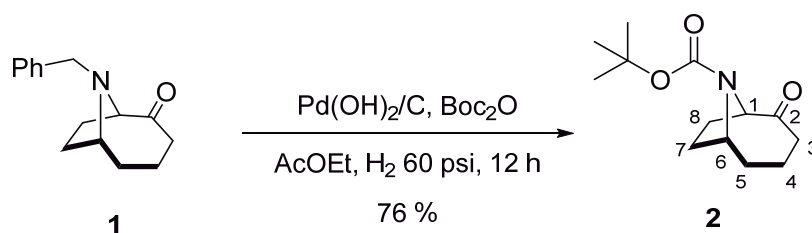
Ejemplo 1: Preparación de bioconjugados de fórmula (I) para **T = R-I**, **L =** CH₂CH₂CH₂, **Z =** -(C=O)NH- y **P =** BSA (seoalbúmina bovina), OVA (ovalbúmina) y HRP (peroxidasa de rábano picante).

20

1.1. *Preparación del éster de N-hidroxisuccinimidilo del hapteno ANA-1 (NHS-ANA-1).*

El material de partida (**1**) se preparó a partir de 1,2-epoxi-5-cicloocteno por adaptación de una ruta previamente publicada [D. B. Kanne et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7864-7865].

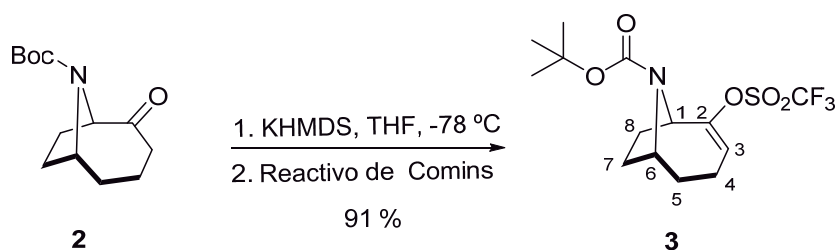
25



Preparación de 2-oxo-9-azabicyclo[4.2.1]nonano-9-carboxilato de terc-butilo (2). Una mezcla de 300 mg (1,308 mmol) de la bencilamina **1**, 57 mg de 20% Pd(OH)₂ sobre

carbono (50% de humedad) y 1,12 equivalentes (320 mg, 1,465 mmol) de carbonato de di-*terc*-butilo en 3,2 mL de AcOEt se mantuvo con agitación bajo una presión 60 psi de H₂ a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró sobre celite, lavando con AcOEt. El filtrado se lavó con 20 mL de una solución saturada de NaHCO₃ y salmuera y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El residuo resultante de la evaporación del disolvente se purificó mediante cromatografía de gel de sílice, empleando hexano-AcOEt 9:1 como eluyente, para obtener la amina *N*-Boc protegida **2** como un aceite incoloro que solidifica a -20 °C (238 mg, 76%).

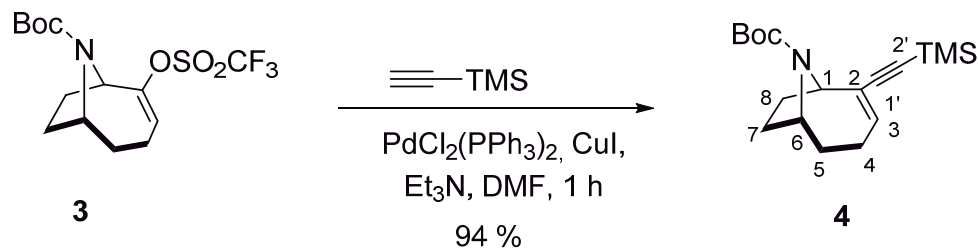
IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2967, 2931, 1709, 1687, 1392, 1343, 1168, 1102. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) (2 rotámetros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario) δ 4,58-4,18 (2H, m, H-1 y H-6), 2,59-2,47 (1H, m, H-3), 2,40-2,25 (2H, m, H'-3 y H-7), 2,25-2,06 (2H, m, H-5 y H-8), 1,96-1,86 (1H, m, H'-7), 1,81-1,62 (4H, m, H-4, H'-5, H'-8), 1,42 (9H, s, CMe₃), ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 215,4 (C-2, C=O), 153,1 (C=O Boc) 80,4 (CMe₃), 65,1 (C-6), 56,6 (C-1), 41,8 (C-3), 33,0 (C-5), 30,0 (C-7), 28,5 (CMe₃), 26,9 (C-8), 19,4 (C-4); EMAR (ES) *m/z* calculada para C₁₃H₂₂NO₃ [M+H]⁺ 240,1594, encontrada 240,1587.



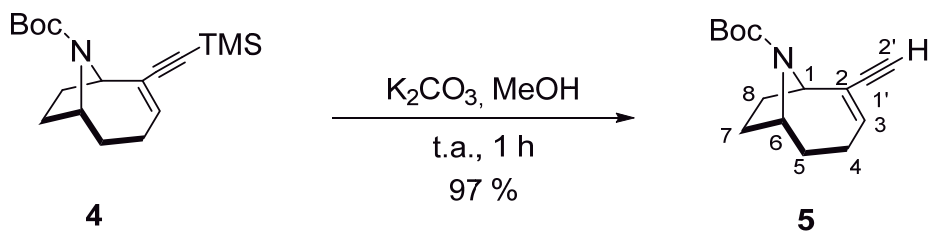
*Preparación de 2-(((trifluorometil)sulfonil)oxi)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-9-carboxilato de *terc*-butilo (3).* En un matraz se preparó una disolución con 123 mg (0,514 mmol) de la cetona **2** en 6,65 mL de THF anhidro bajo atmósfera inerte. La disolución se enfrió a -78 °C y se adicionaron gota a gota 2,0 equivalentes (2,05 mL, 1,027 mmol) de *bis*(trimetilsilil)amida potásica (KHMDS) 0,5 M en tolueno; la reacción se dejó avanzar durante 1,5 h y posteriormente se adicionaron 2,5 equivalentes (504 mg, 1,284 mmol) de disolución de *N*-(5-cloro-2-piridinil)*bis*(trifluorometanosulfonamida) (reactivo de Comins) disueltos en 0,4 mL de THF anhidro. Esta mezcla se agitó durante 1 h adicional manteniendo la temperatura de reacción a -78 °C. Para finalizar, se adicionan 2 mL de una disolución saturada de cloruro amónico a 0 °C, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt (3x15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente se purificó mediante cromatografía de columna, utilizando como eluyente hexano-AcOEt 9:1, para obtener el enol triflato **3** como un aceite incoloro (174,0 mg, 91%). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2972, 1679, 1455, 1400, 1366, 1243,

ES 2 612 751 B1

1201, 1168, 1138, 1072, 884. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (2 rotámetros en proporción 3:1, se describen los datos del mayoritario) δ 5,79-5,72 (1H, m, H-3), 4,55 (1H, m, H-1), 4,44-4,23 (1H, m, H-6), 2,21(2H, m, H-4), 2,20-1,64 (2H, m, H-5), 2,06 (2H, m, H-8), 2,04-1,67(2H, m, H-7), 1,44 (9H, s, CMe_3) ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 154,6 (C-2), 153,1 (C=O Boc), 120,5 (C-3), 116,5 (CF_3), 80,5 (CMe_3), 58,9 (C-1), 54,9 (C-6), 32,4 (C-7), 31,0 (C-8), 30,5 (C-5), 28,3 (CMe_3), 19,7 (C-4) ^{19}F -RMN (282 MHz, CDCl_3) δ -74,4 (s), EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{NO}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 372,1009, encontrada 372,1014.



10 *Preparación de 2-((trimetilsilil)etininil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-9 carboxilato de terc-butilo (4)*. 4,0 equivalentes (655 μL , 4,64 mmol) de trimetilsililacetileno se adicionaron a una mezcla preparada a partir de 430 mg (1,16 mmol) del enol triflato **3**, 81,4 mg (0,116 mmol, 10% mol) de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ y 11,0 mg (0,06 mmol, 5% mol) de CuI bajo atmósfera inerte en 6,2 mL de DMF anhidra. La disolución resultante se desgasificó por sonicación bajo una corriente de nitrógeno, se adicionaron 484 μL (3,48 mmol, 3 equivalentes) de Et_3N y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras comprobar la finalización de la reacción por CCF (hexano: AcOEt , 8:2), la mezcla de reacción se diluyó con 10 mL de agua y se extrajo con Et_2O (3x15 mL), las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución de LiCl al 1,5%, salmuera y se secaron sobre MgSO_4 anhidro. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se purificó por cromatografía en columna de sílice, empleando hexano: AcOEt 8:2 como eluyente, para obtener el enino conjugado **4** como un aceite incoloro (348 mg, 94%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (2 rotámetros en proporción 4:1; se describen los datos del mayoritario) δ 6,12 (1H, m, H-3), 4,58 (1H, m, H-1), 4,42-4,10 (1H, m, H-6), 2,26-2,14 (2H, m, H-4), 2,20-1,89 (2H, m, H-7), 2,15-1,63 (2H, m, H-8), 2,12-1,70 (2H, m, H-5), 1,47 (9H, s, CMe_3), 0,16 (9H, s, SiMe_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3Cl) δ 153,4 (C=O), 138,0 (C-3), 131,7 (C-2), 106,6 (C-1'), 92,6 (C-2'), 79,6 (CMe_3), 59,8 (C-1), 55,6 (C-6), 31,4 (C-7), 31,3 (C-8), 28,8 (C-5), 28,6 (CMe_3), 24,3 (C-4), 0,15 (SiMe_3), EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 320,2040, encontrada 320,2042.

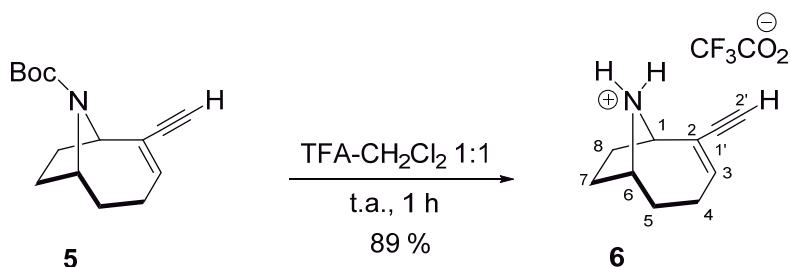


Preparación de 2-etinil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene-9-carboxilato de terc-butilo (5).

Una mezcla formada a partir de 254 mg (0,795 mmol) del enino trimetilsililado **4**, 5,0 equivalentes (550 mg, 3,978 mmol) de K_2CO_3 anhidro en 10 mL de MeOH, se agitó a temperatura ambiente bajo atmosfera de N_2 , controlando su evolución por CCF (usando como eluyente hexano-AcOEt en proporción 8:2). Después de 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con 30 mL de agua y se extrajo con CH_2Cl_2 (3x25 mL), las fases orgánicas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO_4 anhidro. Después de evaporar el disolvente se obtuvo el enino conjugado **5** como un aceite amarillo claro,

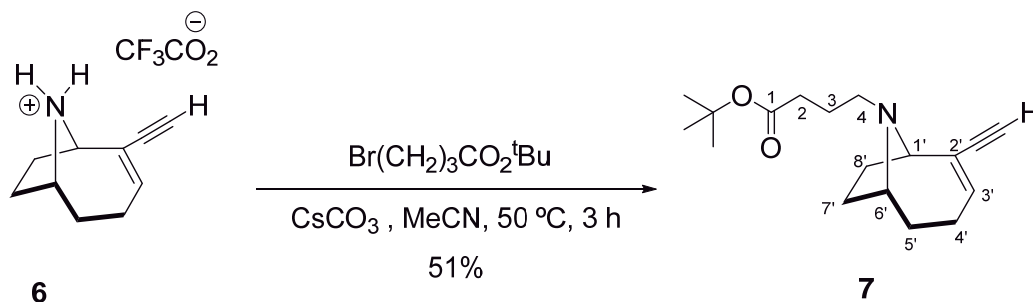
prácticamente puro por ^1H RMN, que no requirió purificación posterior (190 mg, 97%).

IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2973, 2928, 1685, 1404, 1362, 1248, 1168, 1106, 1007, 934, 852; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (mezcla de 2 rotámetros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario) δ 6,16 (1H, dd, $J=6,1, 6,1$ Hz, H-3), 4,59 (1H, m, H-1), 4,40–4,18 (1H, m, H-6), 2,89 (1H, s, H-2'), 2,25 (2H, m, H-4), 2,20–2,12 (3H, m, H-5, H-7, H-8), 1,92–1,81 (1H, m, H'-7), 1,71–1,60 (2H, m, H'-5, H'-8), 1,46 (9H, s, CMe_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3Cl) δ 155,6 (C=O), 138,3 (C-3), 130,1 (C-2), 85,0 (C-1'), 79,7 (CMe_3), 76,0 (C-2'), 60,0 (C-1), 55,6 (C-6), 31,8 (C-8), 31,2 (C-7), 29,2 (C-5), 28,6 (CMe_3), 24,2 (C-4); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 248,1645, encontrada 248,1645.



Preparación del trifluoroacetato 2-etinil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-io (6). Se preparó una disolución a partir de 0,5 mL de ácido trifluoroacético recién destilado en 0,5 mL de CH_2Cl_2 seco, la cual se adicionaron bajo atmósfera inerte a 31,0 mg (0,125 mmol) del enino **5**. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente se eliminó el disolvente y exceso de ácido a presión reducida para obtener un residuo aceitoso marrónáceo correspondiente a la sal con el ácido trifluoroacético del aza-bicyclo-enino conjugado **6** (23,5 mg, 89%) que sin etapa posterior de purificación se llevó directamente a la siguiente etapa de reacción. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 6,43

(1H, m, H-3), 4,38 (2H, m, H-1), 4,28 (1H, m, H-6), 3,0 (1H, s, H-2'), 2,45–1,77 (8H, m, H-5, H-8, H-7, H-4). ^{19}F RMN (282 MHz, CDCl_3) δ -76,4.



Preparación de 4-(2-etinil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)butanoato de *tert*-butilo (**7**).

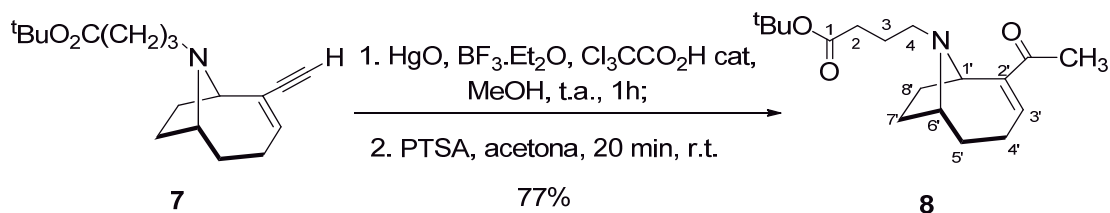
5 Se preparó una disolución a partir de 81,0 mg (0,419 mmol) de la sal del alquino **6**, 3,0 equivalentes (1,26 mmol) de CsCO_3 y 2,5 equivalentes (1,04 mmol) del 4-bromobutanoato de *tert*-butilo en 1,5 mL de acetonitrilo anhidro bajo atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción resultante se agitó a 50 °C durante 3 h y al término de la reacción, ésta se diluyó en agua y solución saturada de NaHCO_3 , se extrajo con

10 CH_2Cl_2 (3x20 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO_4 anhidro. El residuo resultante después de la evaporación del disolvente se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando CHCl_3 -MeOH 9:1 como eluyente, para obtener el alquino *N*-alquilado **7** como un aceite de color ligeramente amarillo (61,0 mg, 51%). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3294,9, 2973,0, 2927,7,

15 1725,8, 1421,5, 1365,8, 1254,9, 1149,4, 951,4, 845,4; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (mezcla de 2 rotámetros en proporción 6:1; se describen los datos del mayoritario) δ 6,25 (1H, ddd, $J = 8,2, 8,2, 0,6$ Hz, H-3'), 3,80 (1H, m, H-1'), 3,47 (1H, m, H-6'), 2,86 (1H, s, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 2,60 (2H, m, H-4), 2,36 y 1,80 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2,32–2,13 (2H, m, H-4'), 2,26 (2H, m, H-2), 2,23–2,15 (2H, m, H-5'), 2,06 y 1,64 (2H, m, H-7' y H'-7'), 1,80

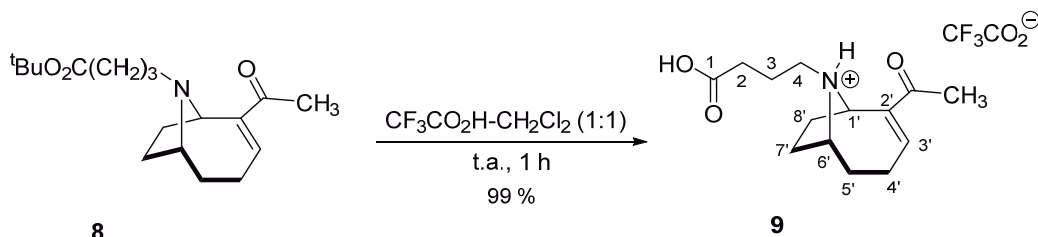
20 (2H, m, H-3), 1,44 (9H, s, CMe_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3Cl) δ 173,3 (C-1), 138,9 (C-3'), 129,1 (C-2'), 86,8 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 80,1 (CMe_3), 75,4 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 64,4 (C-1'), 60,5 (C-6'), 46,4 (C-4), 33,9 (C-2), 31,5 (C-8'), 28,3 (C-7'), 28,2 (CMe_3) 25,24 (C-5'), 24,54 (C-4'), 23,84 (C-3); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 290,2115 encontrada 290,2119.

25

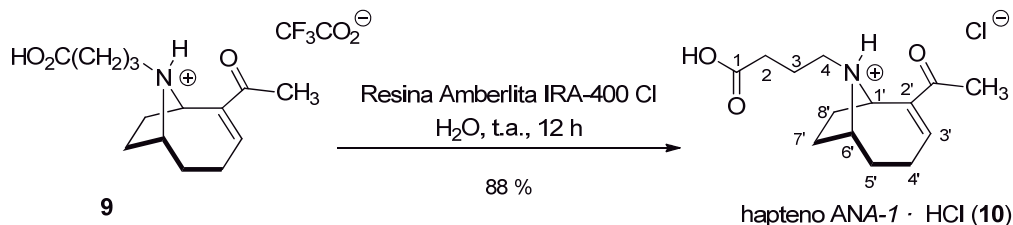


Preparación de 4-(2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)butanoato de terc-butilo (**8**).

4,6 mL de una disolución preparada a partir de 2 mg de ácido tricloroacético y 50 μL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en 10 mL de MeOH anhidro se adicionaron, bajo atmósfera inerte, sobre una disolución del alquino **7** (170,0 mg, 0,587 mmol) y 0,5 equivalentes de HgO (63,7 mg, 0,293 mmol) en 2,4 mL de MeOH anhidro. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente, controlando la misma por CCF (CHCl_3 -MeOH, 9-1), hasta su finalización. Al cabo de aproximadamente 1 h, la mezcla de reacción se vertió sobre 15 mL de agua fría y 5 mL de disolución saturada de NaHCO_3 , se extrajo con CH_2Cl_2 (3x15 mL) y las fases orgánicas se lavaron con salmuera y se secan sobre MgSO_4 anhidro. Tras eliminación del disolvente se obtuvo un aceite amarillo que directamente se sometió a hidrólisis ácida empleando 1,5 equivalentes (167,2 mg, 0,88 mmol) de ácido *p*-toluenosulfónico ($\text{PTSA} \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 3 mL de acetona; la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, la mezcla de reacción se procesó por dilución con 10 mL de H_2O y 5 mL de solución saturada de NaHCO_3 , se extrajo con CH_2Cl_2 (3x10 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. La eliminación del disolvente a presión reducida proporciona un residuo aceitoso ligeramente marrón que se purificó por cromatografía por columna, empleando como eluyente CHCl_3 con 0,5% de Et_3N , para obtener la anatoxina-a *N*-alquilada **8** como un aceite incoloro (139 mg, 77%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 6,92 (1H, m, H-3'), 4,52 (1H, aparente d, $J = 10,6$ Hz, H-1'), 3,49 (1H, m, H-6'), 2,48-2,35 (2H, m, H-4), 2,43-2,35 (2H, m, H-4'), 2,27 (3H, s, Me), 2,31 y 1,86 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2,10 y 1,63 (2H, m, H-7' y H'-7'), 2,23-2,17 (2H, m, H-2), 1,85-1,72 (2H, m, H-5') 1,73-1,63 (2H, m, H-3), 1,41 (9H, s, CMe_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 199,2 (COMe), 173,2 (CO_2), 148,6 (C-2'), 143,2 (C-3'), 80,0 (CMe_3), 60,6 (C-6'), 56,7 (C-1'), 48,1 (C-4), 33,7 (C-2), 31,3 (C-8'), 28,6 (C-7'), 28,2 (CMe_3), 25,6 (MeCO), 25,5 (C-5'), 25,0 (C-4'), 24,2 (C-3); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 308,2220 encontrada 308,2234.

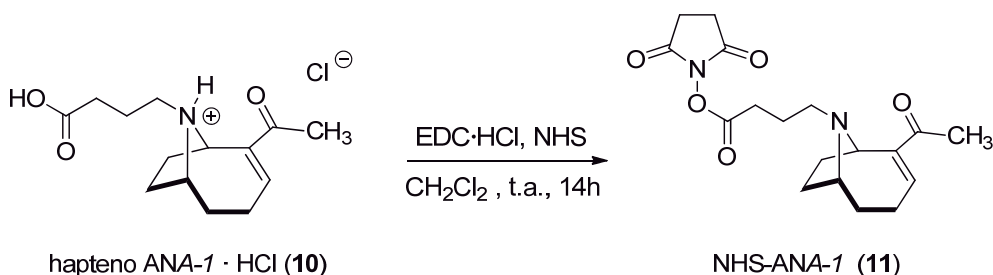


Preparación del 2,2,2-trifluoroacetato de 4-(2-acetil-9-(3-carboxipropil)-azabicyclo [4.2.1]non-2-en-9-ilo (Hapteno ANA-1, **9**). 30,5 mg (99,0 μmol) del éster *terc*-butílico **8** se trataron con 1 mL de una mezcla 1:1 de $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Al finalizar la reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida hasta sequedad, obteniendo el hapteno ANA-1 (**9**) en forma de sal del ácido trifluoroacético como un aceite incoloro (36 mg, 99%). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2915,9, 2848,3, 1669,1, 1418,4, 1198,0, 1132,8, 754; ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 7,50 (1H, m, H-3'), 5,19 (1H, aparente t, $J = 11,5$ Hz, H-1'), 4,22 (1H, m, H-6'), 3,16 (2H, m, H-4), 2,65-2,55 (2H, m, H-4'), 2,47 (2H, m, H-2), 2,35 (3H, s, Me), 2,23 y 2,03 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2,19 y 1,85 (2H, m, H-7' y H'-7'), 2,03 (2H, m, H-3), 1,89-1,79 (2H, m, H-5); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 196,0 (COMe), 176,0 (CO_2), 161,4 (F_3CCO_2^-), 149,0 (C-2'), 148,0 (C-3'), 64,3 (C-6'), 57,0 (C-1'), 49,0 (C-4), 32,9 (C-2), 32,9 (C-8'), 29,3 (C-7'), 26,8 (C-5'), 25,4 (Me), 23,5 (C-4'), 20,7 (C-3); ^{19}F RMN (282 MHz, CD_3OD) δ -77,73; EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 252,1594, encontrada 252,1596.

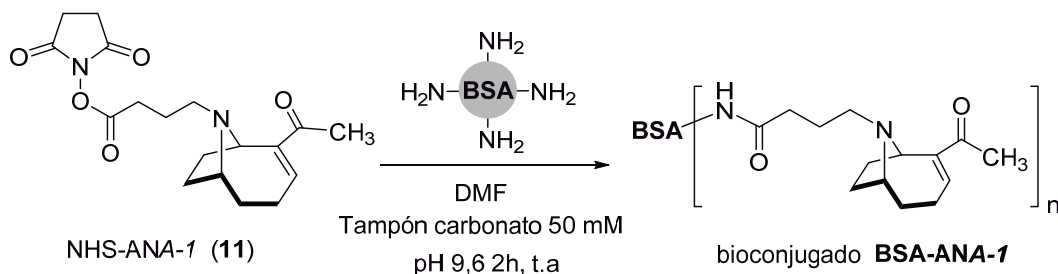


Preparación del hidrocloreuro del ácido 4-(2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-ilo)butanoico (Hidrocloreuro del hapteno ANA-1, **10**). 80 mg de resina amberlite IRA-400, previamente acondicionada, se adicionó a una disolución preparada a partir de 36 mg (0,098 mmol) de la sal del ácido trifluoroacético del hapteno ANA-1 (**9**) en 1 mL de H_2O Milli-Q y la suspensión se dejó con agitación suave durante una noche. La mezcla de reacción se filtró para separar la resina y el filtrado acuoso se liofilizó para obtener un sólido espumoso muy higroscópico correspondiente al hidrocloreuro del hapteno ANA-1 (**10**) (24,9 mg, 88%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (1H, aparente t, $J = 5,9$ Hz, H-3'), 5,13 (1H, aparente d, $J = 7,9$ Hz, H-1'), 4,14 (1H, m, H-6'), 3,01 (2H, m, H-4), 2,59 (2H, m, H-4'), 2,42 (2H, m, H-2), 2,42 y 1,96 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2,35 (3H, s, Me), 2,32 y 1,96 (2H, m, H-7' y H'-7'), 1,96 (2H, m, H-3), 1,81-1,72 (2H, m, H-5'); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 196,0 (COMe), 176,0 (CO_2), 149,0 (C-2'), 148,0 (C-3'), 64,3

(C-6'), 57,0 (C-1'), 49,0 (C-4), 33,0 (C-2), 32,9 (C-8'), 29,3 (C-7'), 26,8 (C-5'), 25,4 (Me), 23,5 (C-4'), 20,7 (C-3); EMAR (ES) m/z calculada para $C_{14}H_{22}NO_3$ $[M+H]^+$ 252,1594, encontrada 252,1597.



5 *Preparación del éster de N-hidroxisuccinimidilo del hapteno ANA-1 (11).* Se preparó una disolución a partir de 13,2 mg (0,046 mmol) del hidrocloreuro del hapteno ANA-1 (**10**), 1,5 equivalentes (7,9 mg, 0,069 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 1,5 equivalentes (13,2 mg, 0,069 mmol) de EDC·HCl en 900 μ L de CH_2Cl_2 seco bajo atmosfera de N_2 . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 h. Tras este tiempo
10 se confirmó por CCF, empleando cloroformo-acetona 9:1 como eluyente, la finalización de la reacción, tras lo cual la mezcla de reacción se concentró a sequedad bajo vacío y el residuo obtenido se disolvió en DMF para obtener una disolución aproximadamente 50 mM del éster activo NHS-ANA-1 (**11**), que directamente se utilizó para la preparación de los bioconjugados correspondientes.



15

1.2. *Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-1 con BSA (BSA-ANA-1).* 200 μ L de la disolución del éster activo NHS-ANA-1 (**11**) en DMF obtenida en la reacción anterior (aproximadamente 50 mM) se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 1,8 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. La reacción de conjugación se incubó durante 2 h con agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los conjugados se purificaron por exclusión molecular en 3 columnas cromatográficas HiTrap Desalting Columns de 5 mL cada una, acopladas en serie, utilizando como tampón de elución fosfato sódico 100 mM, pH 7,4. Finalmente, tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas
20 que contenían el bioconjugado de BSA se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL con tampón de elución y se almacenaron a -20 °C.

25

Para determinar la carga hapténica (**n**) obtenida en el conjugado, una alícuota de 100 μ L del bioconjugado BSA–ANA–1 purificado se dializó (diálisis contra 5 L de agua desionizada con al menos 2 a 3 cambios de agua por 24 h a 4 °C); finalmente, el producto dializado se liofilizó y el número de moléculas de hapteno conjugadas por molécula de BSA se determinó mediante MALDI-TOF-MS (**n** = 8, ver Tabla 1, entrada 2).

TABLA 1, Valores de la carga hapténica de los conjugados proteicos determinados por MALDI-TOF-MS

		RM_0	m/z	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/hapteno$	n
1	BSA	-	66431,0	-	-	-
2	BSA–ANA–1	24	68316,2	1885,2	233,3	8,0
3	BSA–ANA–2	24	69810,5	3379,5	233,3	14,5
4	BSA–ANA–3	24	69952,8	3522,5	220,1	16,0
5	OVA	-	42749,0	-	-	-
6	OVA–ANA–1	8	43504,0	755,0	233,3	3,2
7	OVA–ANA–2	8	44715,0	1966,0	233,3	8,4
8	OVA–ANA–3	8	44500,0	1751,0	220,1	7,9
9	HRP	-	43973,5	-	-	-
10	HRP–ANA–1	10	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
11	HRP–ANA–2	10	44937,4	963,5	233,3	4,1
12	HRP–ANA–3	10	44529,0	555,5	220,1	2,5

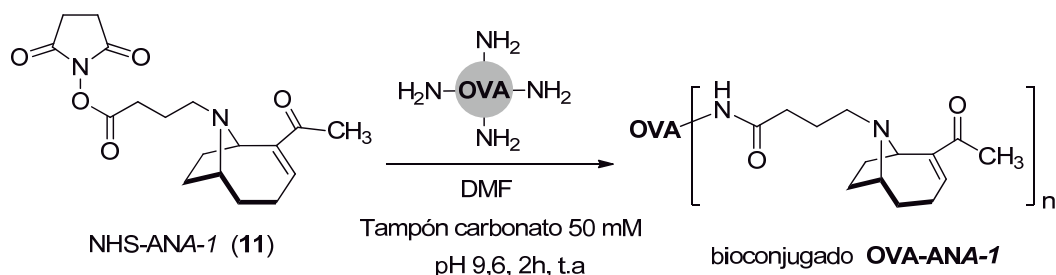
RM_0 : relación molar inicial hapteno/proteína utilizada para la conjugación

n: relación molar hapteno/proteína obtenida para cada conjugado

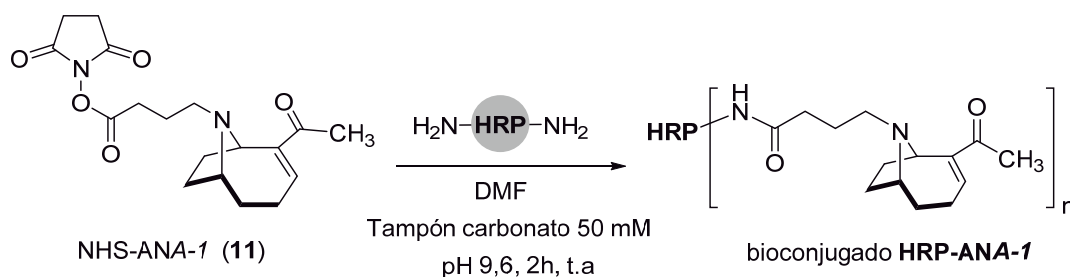
$\Delta(m/z)$: (m/z conjugado) – (m/z proteína de referencia)

$\Delta m/hapteno$: incremento de masa por cada molécula de hapteno conjugada

n.d.: no determinado



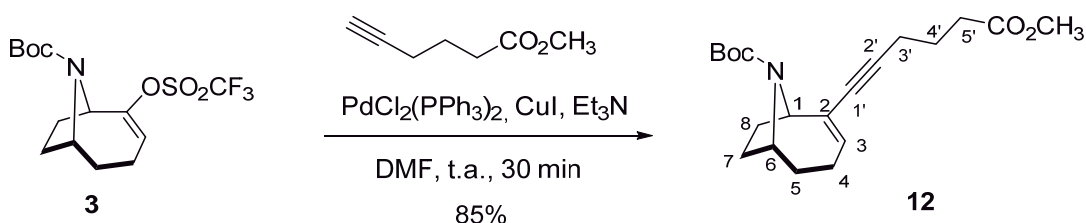
- 1.3. *Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-1 con OVA (OVA-ANA-1).* A partir de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-ANA-1 (11), se tomaron 100 μL y se añadieron lentamente y con agitación constante a un volumen de 1,9 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Después de 2 h de reacción en agitación suave y a temperatura ambiente, se procedió a la purificación del bioconjugado como se ha descrito anteriormente para el conjugado de BSA. Las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0,01% (v/v) y, se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Una alícuota del conjugado OVA-ANA-1 recién obtenido se dializó y liofilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número de moléculas de hapteno (11) acoplados a la proteína mediante MALDI-TOF-MS ($n = 3.2$, ver Tabla 1, entrada 6).



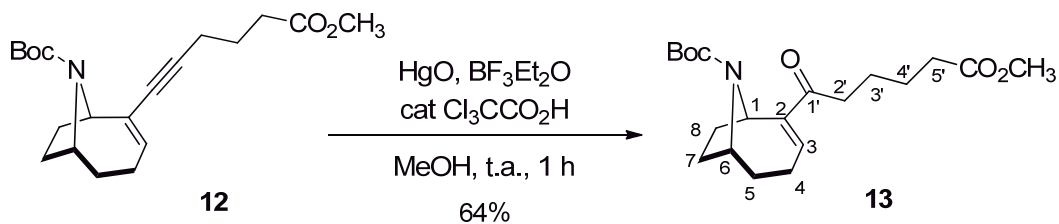
- 1.4. *Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-1 con HRP (HRP-ANA-1).* A partir de una disolución 5 mM del hapteno activado NHS-ANA-1 (11) en DMF, se tomaron 100 μL y se añadieron lentamente y con agitación constante y suave sobre 0,9 mL de una disolución de HRP a una concentración de 2,5 mg/mL en tampón carbonato 50 mM, pH 7,4. La reacción de conjugación se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el bioconjugado se purificó siguiendo el procedimiento descrito previamente para los bioconjugados de BSA y OVA, y se llevó a concentraciones conocidas de entre 250–650 $\mu\text{g/mL}$ en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenaron a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

Ejemplo 2: Preparación de bioconjugados de fórmula (I) para $T = R-II$, $L = CH_2CH_2CH_2CH_2$, $Z = -(C=O)NH-$ y $P = BSA$, OVA y HRP .

2.1. Preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno ANA-2 (**NHS-ANA-2**).



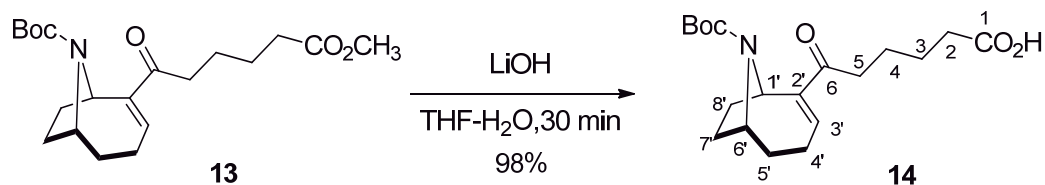
Preparación de 2-(6-metoxi-6-oxohex-1-in-1-il)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de metilo (**12**). A una mezcla preparada a partir de 108 mg (0,291 mmol) del enol triflato **3**, 20,4 mg (10% mol, 0,029 mmol) de $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ y 2,7 mg (5% mol, 0,014 mmol) de CuI bajo atmósfera de N_2 se adicionaron 1,5 mL de DMF anhidra y 4,0 equivalentes (153 μL , 1,167 mmol) del 5-hexinoato de metilo comercial. La disolución resultante se desgasificó por ciclos de vacío bajo una corriente de nitrógeno y se adicionaron 3,0 equivalentes (122 μL , 0,875 mmol) de Et_3N . Después de 1 h de agitación a temperatura ambiente, se comprobó por CCF que el triflato de partida se había consumido completamente. La mezcla de reacción se diluyó con 10 mL de agua y se extrajo con Et_2O (3x15 mL); las fases orgánicas se lavaron sucesivamente con disolución de LiCl al 1,5% y salmuera y se secaron sobre MgSO_4 anhidro. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando hexano-AcOEt 9:1 como eluyente, para obtener en primer lugar el producto de homoacoplamiento del alquino (10,9 mg, 11%), seguido del producto de acoplamiento cruzado del enino conjugado, **12**, como un aceite incoloro (86,4mg, 85%). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2953, 2400, 2350, 1733, 1690, 1402,5, 1365,1, 1164,7; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (mezcla de 2 rotámetros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario) δ 5,94 (1H, dd, $J = 11,6, 5,5$ Hz, H-3), 4,51 (1H, m, H-1), 4,39–4,13 (1H, m, H-6), 3,66 (3H, s, CO_2Me), 2,43 (2H, t, $J = 7,4$ Hz, H-5'), 2,31 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, H-3'), 2,25–2,18 (2H, m, H-4), 2,16–2,04 (3H, m, H-8, H-7), 1,83 (2H, dt, $J = 6,8$ Hz, H-4'), 1,83–1,68 (3H, m, H-5, H'-7), 1,44 (9H, s, CMe_3Boc); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 173,1 (CO_2CH_3), 153,6 (C=O Boc), 135,2 (C-3), 130,9 (C-2), 87,4 (C-2'), 82,6 (C-1'), 79,4 (CMe_3Boc), 60,5 (C-1), 55,1 (C-6), 51,7 (CO_2CH_3), 32,9 (C-5'), 31,3 (C-7), 30,2 (C-8), 29,4 (C-5), 28,6 (CMe_3Boc), 24,1 (C-4'), 23,6 (C-4), 18,9 (C-3'), EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348,2169, encontrada 348,2168.



Preparación de 2-(6-metoxi-6-oxohexanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de metilo (**13**). A una disolución preparada a partir de 80 mg del alquino **12** (0,230 mmol) y 0,5 equivalentes de HgO (25 mg, 0,115 mmol) en 900 μL de MeOH anhidro se

5 adicionaron gota a gota, bajo atmósfera de N_2 , 1,8 mL de una disolución preparada a partir de 2 mg de ácido tricloroacético y 50 μL de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ en 10 mL de MeOH anhidro. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente hasta desaparición del alquino, monitorizando la reacción por CCF empleando hexano-AcOEt 7:3 como eluyente. Aproximadamente después de 1 h, la mezcla de reacción

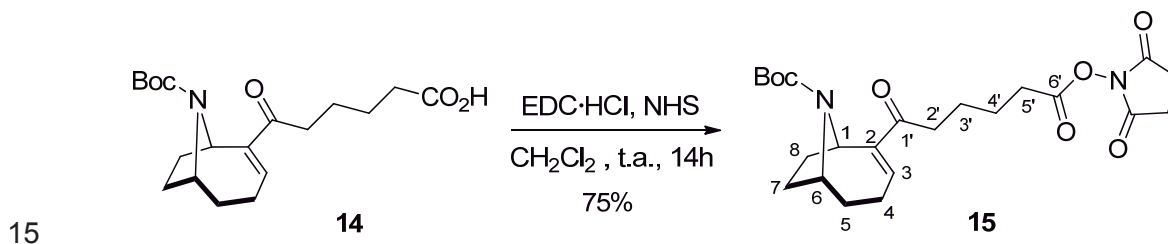
10 se viertió sobre agua fría, se basificó con una disolución saturada de NaHCO_3 , se extrajo con CH_2Cl_2 (3x15 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente a vacío proporcionó un aceite amarillo que se purificó por cromatografía de columna, empleando como eluyente hexano-AcOEt 8:2, obteniéndose la enona conjugada **13** como un aceite ligeramente amarillo (65 mg, 64%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (mezcla de 2 rotámetros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario) δ 6,79 (1H, m, H-3), 5,13 (1H, m, H-1), 4,42–4,28 (1H, m, H-6), 3,65 (3H, s, CO_2Me), 2,65 (2H, m, H-2'), 2,42 (2H, m, H-5'), 2,33 (3H, m, H-4', H-4), 2,17–2,07 (2H, m, H-8, H'-4), 1,65 (7H, m, H-3', H-5, H-7, H'-8), 1,39 (9H, s, CMe_3 Boc); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 199,7 (C-1', C=O), 173,0 (CO_2Me), 153,2 (C=O Boc), 150,0 (C-2), 141,1 (C-3), 79,4 (CMe_3 Boc), 55,7 (C-6), 53,3 (C-1), 51,7 (CO_2CH_3), 36,9 (C-5'), 35,5 (C-2'), 31,7 (C-8), 30,5 (C-7), 28,9 (C-5), 28,2 (CMe_3 Boc), 24,9 (C-3'), 24,4 (C-4'), 24,3 (C-4); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 366,2275, encontrada 366,2274.



Preparación del ácido 6-(9-(*tert*-butoxicarbonil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)-6-oxohexanoico (**14**). Se preparó una disolución de 97 mg (0,27 mmol) del éster metílico **13** en 2 mL de THF, se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota con agitación una disolución fría de 2 mL de una disolución acuosa 2,7 M (5,4 mmol, 10 equivalentes finales) de LiOH. Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 min, la mezcla

30 de reacción se viertió sobre agua-hielo y se acidificó hasta pH 2–3 con una disolución

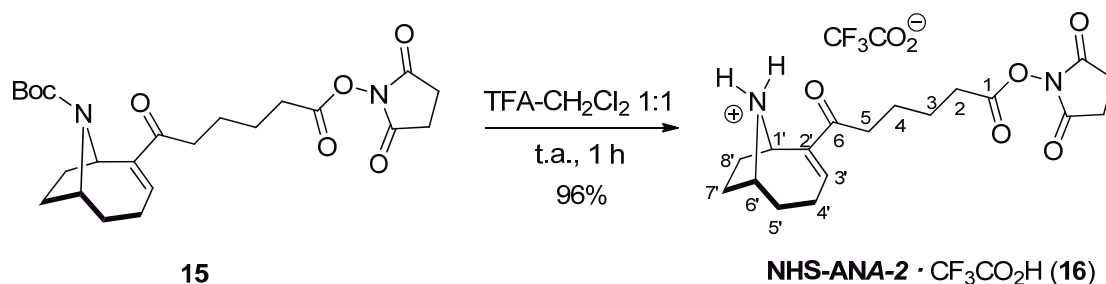
acuosa 1 M de KHSO₄ fría. La mezcla se extrajo con AcOEt (3x15 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. La eliminación del disolvente a vacío proporcionó el ácido carboxílico **14** como un aceite incoloro (93 mg, 98%), que por RMN mostró estar prácticamente puro y por lo tanto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2973, 2931,6, 2356,8, 1662,4, 1409, 1365,1, 1246,5, 1216, 1166,9, 1115,8, 931,7, 750; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) (una mezcla de 2 rotámetros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario), δ 6,79 (1H, m, H-3'), 5,13 (1H, aparente d, *J* = 8,9 Hz, H-1'), 4,44–4,25 (1H, m, H-6'), 2,65 (2H, m, H-5), 2,42 (5H, m, H-2, H-4', H-8'), 2,10 (4H, m, H-3, H'-8', H-7'), 1,65 (5H, m, H-4, H-5', H'-7'), 1,39 (9H, s, CMe₃ Boc); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 199,6 (C=O, C-6), 178,9 (CO₂H), 157,6 (C=O Boc), 149,9 (C-2'), 141,2 (C-3'), 79,6 (CMe₃ Boc), 55,1 (C-6'), 53,3 (C-1'), 36,7 (C-5), 33,6 (C-2), 31,5 (C-8'), 31,1 (C-7'), 30,5 (C-4), 28,9 (C-5'), 28,5 (CMe₃ Boc), 24,5 (C-4'), 24,3 (C-3); EMAR (ES) *m/z* calculada para C₁₉H₃₀NO₅ [M+H]⁺ 352,2118, encontrada 352,2131.



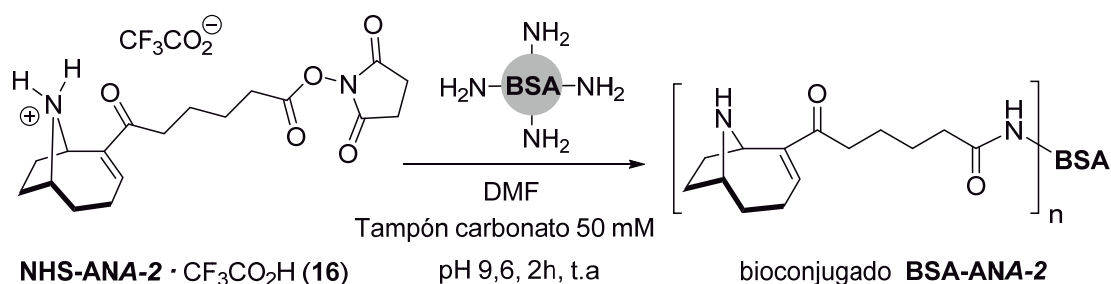
Preparación de 2-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (**15**). Se preparó una disolución a partir de 80 mg (0,228 mmol) del ácido **14**, 1,5 equivalentes (39,3 mg, 0,341 mmol) de *N*-hidroxisuccinimida y 1,5 equivalentes (65,4 mg, 0,341 mmol) de EDC·HCl en 3 mL de CH₂Cl₂ seco bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 h. Tras este tiempo se confirmó por CCF, empleando cloroformo-acetona 9:1 como eluyente, la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se adicionaron 5 mL de una solución saturada de NH₄Cl y se extrajo con el mismo disolvente (3x10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Tras evaporar el disolvente se obtuvo un aceite incoloro que se purificó por cromatografía en columna, utilizando como eluyente CHCl₃, para obtener el éster de *N*-hidroxisuccimidilo **15** (77 mg, 75%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) (una mezcla de 2 rotámetros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario), δ 6,79 (1H, m, H-3), 5,13 (1H, m, H-1), 4,44–4,25 (1H, m, H-6), 2,83 (4H, s ancho, COCH₂CH₂CO), 2,65 (2H, m, H-2'), 2,42 (5H, m, H-5', H-4, H-8), 2,10 (4H, m, H-3', H'-8, H-7), 1,65 (5H, m, H-4', H-5, H'-7), 1,39 (9H, s, CMe₃ Boc); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 199,6 (C=O, C-1'), 168,9 (COCH₂CH₂CO), 165,5 (C=O, C-6'), 157,6 (C=O Boc), 149,9 (C-2), 141,2 (C-3), 79,6 (CMe₃ Boc), 55,1

20
25
30

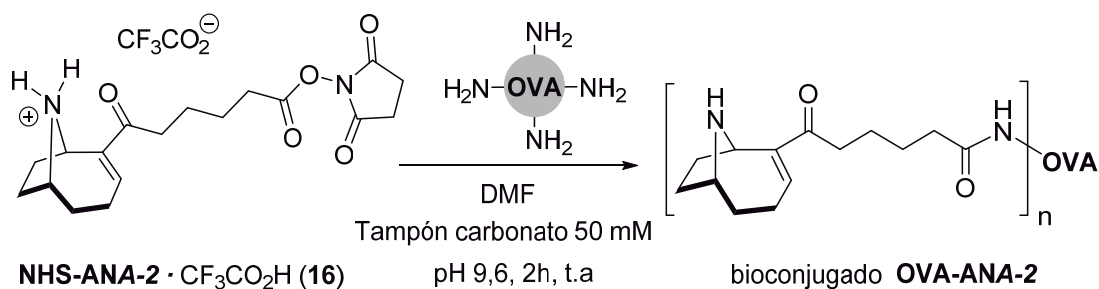
(C-6), 53,3 (C-1), 36,7 (C-2'), 33,6 (C-5'), 31,5 (C-8), 31,1 (C-7), 30,5 (C-4'), 28,9 (C-5), 28,5 (CMe₃ Boc), 25,6 (COCH₂CH₂CO), 24,5 (C-4), 24,3 (C-3'); EMAR (ES) *m/z* calculada para C₂₃H₃₃N₂O₇ [M+H]⁺ 449,2282, encontrada 449,2281.



- 5 *Preparación de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-6-(9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)-6-oxohexanoato como sal del ácido trifluoroacético (16).* Una disolución de 25 mg (0,055 mmol) del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **15** en 1 mL de una mezcla 1:1 de CF₃CO₂H-CH₂Cl₂ se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ durante 1 h. El disolvente y exceso de CF₃CO₂H se evaporaron a presión reducida para proporcionar
- 10 la sal con el ácido trifluoroacético del éster activo NHS-ANA-2 (**16**) como un aceite incoloro (24,4 mg, 96%). ¹H RMN (300 MHz, THF-d₈) 7,26 (1H, dd, *J* = 8,0, 3,7 Hz, H-3'), 5,13 (1H, aparente d, *J* = 9,2 Hz, H-1'), 4,30 (1H, m, H-6'), 2,75 (4H, s ancho, COCH₂CH₂CO), 2,75–2,70 (2H, m, H-5), 2,64–2,59 (4H, m, H-2, H-4'), 2,51–2,40 (2H, m, H-8'), 2,36–2,27 (1H, m, H-7'), 2,10 (1H, m, H-5'), 1,98 (1H, m, H-7'), 1,95–1,82
- 15 (3H, m, H-4, H-5'), 1,70 (2H, m, H-3), ¹⁹F RMN (282 MHz, THF-d₈) δ -76,86.

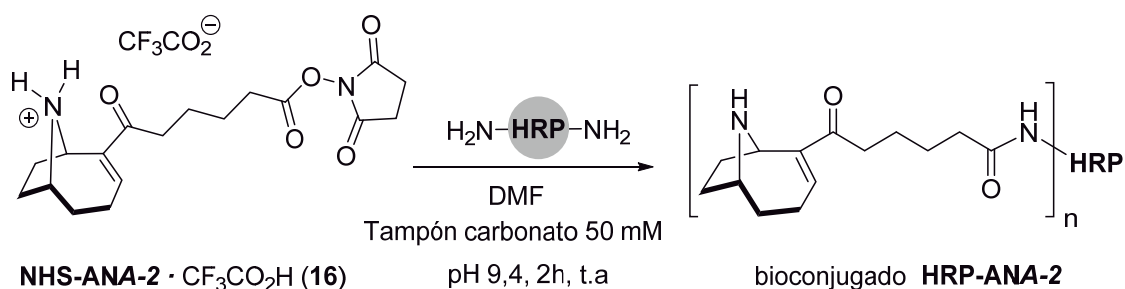


- 2.2. *Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-2 con BSA (BSA-ANA-2).* Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado BSA-ANA-1 a partir 200 μL de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-ANA-2 (**16**) y 1,8 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución y se almacenaron a -20 °C. El número de moléculas de (**16**) conjugadas por cada molécula de BSA,
- 25 determinado por MALDI-TOF-MS, fue de *n* = 14,5 (ver Tabla 1, entrada 3).



2.3. Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-2 con OVA (**OVA-ANA-2**).

Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado OVA-ANA-1 a partir de 100 μ L de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-ANA-2 (16) y 1,9 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0.01% (v/v) y se almacenaron a -20 °C. El número de moléculas de (16) conjugadas por cada molécula de OVA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $n = 8,4$ (ver Tabla 1, entrada 7).

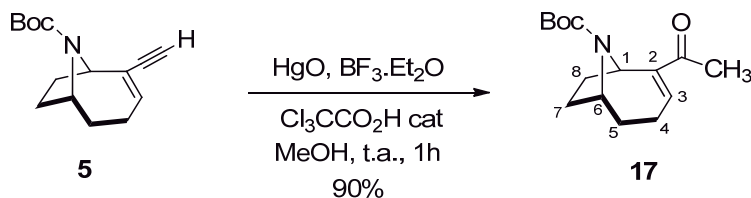


2.4. Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-2 con HRP (**HRP-ANA-2**).

Preparado a partir de 100 μ L de una disolución 5 mM del hapteno activado NHS-ANA-2 (16) en DMF y 0,9 mL de una disolución de HRP (2,5 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 7,4. Tras la purificación cromatográfica, las fracciones obtenidas conteniendo el bioconjugado se llevaron a concentraciones conocidas de entre 250–650 μ g/mL en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenaron a 4 °C. El número de moléculas de (16) conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $n = 4,1$ (ver Tabla 1, entrada 11).

Ejemplo 3: Preparación de bioconjugados de fórmula (I) para **T** = **R-III**, **L** = =N–O–CH₂, **Z** = –(C=O)NH– y **P** = BSA, OVA y HRP.

3.1. Preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno ANA-3 (**NHS-ANA-3**).



5

Preparación de 2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de terc-butilo (**17**).

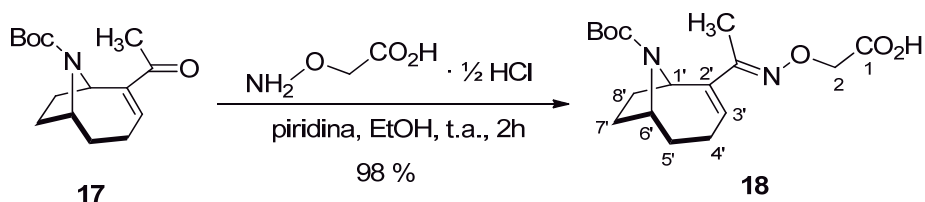
Una disolución preparada a partir de 1 mg de ácido tricloroacético, 22 μL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en 1,9 mL de metanol se adicionó gota a gota sobre una mezcla preparada a partir de 140 mg (0,569 mmol) del alquino **5** (0,283 mmol) y 0,5 equivalentes de HgO (62 mg, 0,284 mmol) en 3,6 mL de MeOH anhidro bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se adicionaron a la mezcla de reacción 300 μL de agua destilada y se continuó la agitación 15 min adicionales. Finalizado el tiempo indicado, la mezcla de reacción se vertió sobre 10 mL de agua fría y 5 mL de disolución acuosa saturada de NaHCO_3 , se extrajo con CH_2Cl_2 (3x15 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a presión reducida proporcionando un aceite amarillo. La purificación por cromatografía por columna, utilizando como eluyente hexano-AcOEt 9:1, proporcionó *N*-Boc anatoxina-a (**17**) como un aceite incoloro (134 mg, 90%). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2978,5, 2925,8, 2853,6, 1690,6, 1662,9, 1404,7, 1390, 1363,2, 1337,5, 1231, 1168, 1108,1, 991,3; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 3:1; se describen los datos del mayoritario) δ 6,81 (1H, m, H-3), 5,12 (1H, m, H-1), 4,44–4,23 (1H, m, H-6), 2,52–2,43 (2H, m, H-4), 2,29 (3H, s, Me), 2,22–2,0 (3H, m, H-8, H-7), 1,69–1,60 (3H, m, H-5, H-7), 1,37 (9H, s, CMe_3); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 197,9 (C=O Boc), 150,5 (C=O Boc), 142,2 (C-2), 141,4 (C-3), 79,5 (CMe_3 Boc), 55,8 (C-6), 53,2 (C-1), 31,6 (C-8), 30,5 (C-7), 29,1 (C-5), 28,9 y 28,6 (CMe_3 Boc), 25,5 (Me), 24,3 (C-4); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 266,1751, encontrada 266,1747.

10

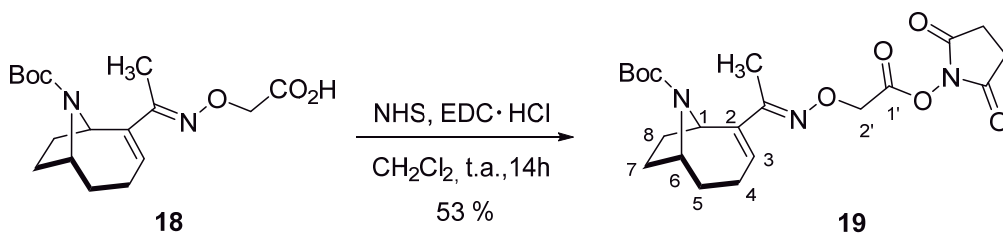
15

20

25



Preparación del ácido 2-(((*E*)-1-(9-(*tert*-butoxicarbonil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)etiliden)amino)oxi)acético (**18**). 46 μ L de piridina se adicionaron a una disolución de 50 mg (0,178 mmol) de *N*-Boc anatoxina-a (**17**) y 3,0 equivalentes (0,534 mmol) del clorhidrato del ácido amino-oxiacético en 3,2 mL de etanol seco bajo atmósfera de argón. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, al término de las cuales se confirmó por CCF (usando como eluyente $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CO}_2\text{H-MeOH}$ en proporción 92:4:4) el consumo de todo el material de partida. La mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de 15 mL de agua-hielo y 10 mL de HCl 1 M, se extrajo con CHCl_3 (4x10 mL) y las fases orgánicas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. La evaporación del disolvente a presión reducida proporcionó un aceite ligeramente amarillo correspondiente a la oxima **18** (59 mg, 98%) que por ^1H RMN mostró ser prácticamente pura y no precisó de purificación adicional. IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2972,6, 2929,2, 2539,5, 1739,9, 1674,0, 1593,5, 1476,5, 1408,4, 1364, 1336,8, 1257,2, 1168,8, 1,109,8, 1066,4; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario) δ 6,07 (1H, m, H-3'), 5,15 (1H, m, H-1'), 4,66 (2H, m, H-2), 4,36 (1H, m, H-6'), 2,39–2,25 (2H, m, H-4'), 2,22–2,12 (3H, m, H-7', H-8'), 2,01 (3H, s, Me-C=N), 1,78–1,51 (3H, m, H-5', H-7'), 1,38 (9H, s, CMe_3 Boc) ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 172,9 (C-1), 157,7 (C=NO), 153,7 (CO_2 Boc), 144,9 (C-2'), 132,1 (C-3'), 79,1 (CMe_3 Boc), 68,6 (C-2), 55,5 (C-6'), 55,2 (C-1'), 34,3 (C-8'), 31,5 (C-7'), 28,6 (CMe_3 Boc), 24,2 (C-4'), 11,3 (Me-C=N); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 339,1914, encontrada 339,1912.



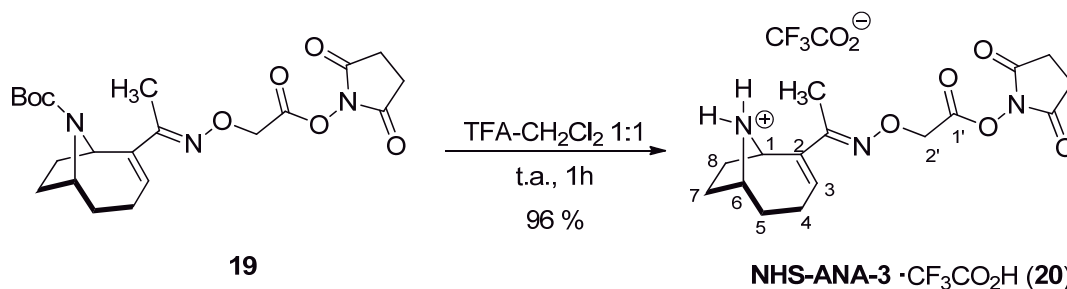
Preparación de 2-((*E*)-1-((2-((-1-il)oxi)-2-oxoetoxi)imino)etil-9-azabicyclo [4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (**19**). Una disolución de 86,6 mg (0,256 mmol) del ácido **18**, 1,5 equivalentes (44,2 mg, 0,384 mmol) de *N*-hidroxisuccinimida y 1,5 equivalentes (73,6 mg, 0,384 mmol) de EDC·HCl en 6,0 mL de CH_2Cl_2 seco se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N_2 y el avance de la reacción se controló por CCF, usando cloroformo-acetona 9:1 como eluyente. Tras 17 h de reacción se confirmó la

desaparición del material de partida, la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, luego se adicionaron 2 mL de una disolución saturada de NH₄Cl y se extrajo con el mismo disolvente (3x10 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras evaporar el disolvente a vacío se obtuvo un

5 aceite incoloro que se purificó por cromatografía en columna, utilizando como eluyente CHCl₃, obteniéndose el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **19** (59 mg, 53%). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2973, 2928,6, 1826,7, 1787,8, 1737,8, 1682,6, 1407,4, 1363,4, 1199,6, 1169,3, 1109,8, 1071,4, 861, 750,7; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) (una mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se describen los datos del mayoritario) δ 6,05 (1H, ddd, *J* = 6,1, 6,1,

10 0,5 Hz, H-3), 5,15 (1H, m, H-1), 4,97 (2H, m, H-2'), 4,31 (1H, m, H-6), 2,84 (4H, s ancho, COCH₂CH₂CO), 2,37-2,20 (3H, m, H₂-4 y H-8), 2,20-2,03 (2H, m, H-5 y H-7), 2,00 (3H, s, Me), 1,80-1,55 (3H, m, H'-8, H'-7 y H'-5), 1,37 (9H, s, Me₃C-Boc); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 168,8 (COCH₂CH₂CO), 165,5 (C-1'), 157,7 (C=NO), 153,7 (CO₂-Boc), 144,9 (C-2), 132,1 (C-3), 79,1 (Me₃C-Boc), 68,6 (C-2'), 55,5 (C-6), 55,2 (C-1),

15 31,9 (C-5), 31,5 (C-8), 29,8 (C-7), 28,6 (Me₃C-Boc), 25,7 (COCH₂CH₂CO), 24,2 (C-4), 11,3 (Me); EMAR (ES) *m/z* calculada para C₂₁H₃₀N₃O₇ [M+H]⁺ 436,2078 encontrada 436,2083.

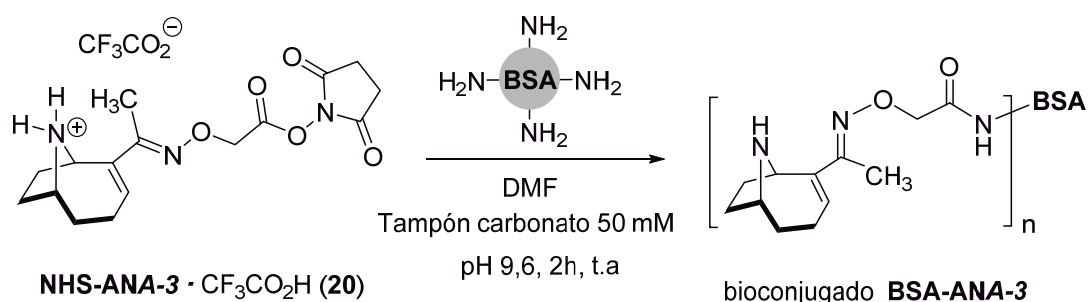


20 *Preparación de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 2-(((E)-1-(-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)ethylidene)amino)oxi)acetato como sal del ácido trifluoroacético (NHS-ANA-3, 20).* Una disolución de 28,0 mg (0,064 mmol) del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **19** en 1 mL de una mezcla 1:1 de CF₃CO₂H-CH₂Cl₂ se agitó durante 1 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. El curso de la reacción se monitorizó por CFF,

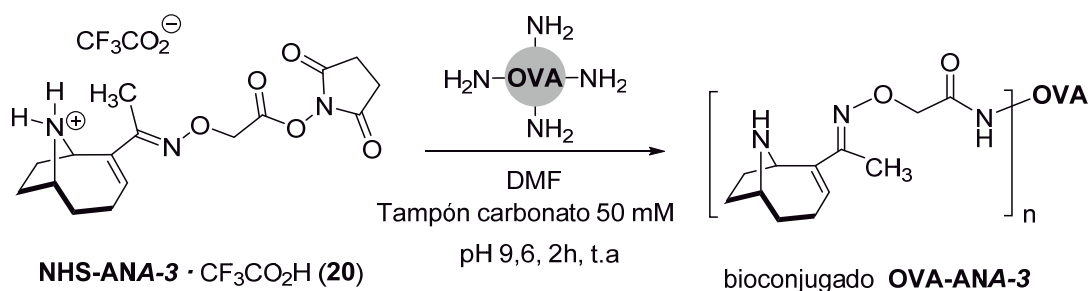
25 empleando cloroformo-acetona 8:2 como eluyente, para comprobar la ausencia del material de partida. Finalizada la reacción, el disolvente y el exceso de CF₃CO₂H se evaporaron a presión reducida, para proporcionar un aceite incoloro correspondiente al éster activo NHS-ANA-3 como sal del ácido trifluoroacético (**20**) (27,7 mg, 96%). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2948,1, 2359,6, 1783,8, 1737,4f, 1705,2, 1668,8, 1429,5, 1191,0, 1132,7,

30 1074,1, 720,1; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6,45 (1H, ddd, *J* = 6,0, 6,0, 0,5 Hz, H-3), 5,43 (1H, m, H-1), 4,92 (2H, aparente s ancho, H-2'), 4,37 (1H, m, H-6), 2,82 (4H, s ancho, COCH₂CH₂CO), 2,56 (3H, m, H₂-4 y H-8), 2,34 (1H, m, H-5), 2,06-1,98 (3H, m,

H'-8, H'-5 y H-7), 2,01 (3H, s, Me), 1,88 (1H, m, H'-7); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 169,4 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 165,3 (C-1'), 156,6 (C=NO), 140,3 (C-2), 136,3 (C-3), 69,4 (C-2'), 59,6 (C-6), 54,4 (C-1), 30,1 (C-8), 28,8 (C-7), 27,9 (C-5), 25,1 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 23,3 (C-4), 10,8 (Me); ^{19}F RMN (282 MHz, CDCl_3) δ -76,34 (s); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 336,1554, encontrada 336,1565.

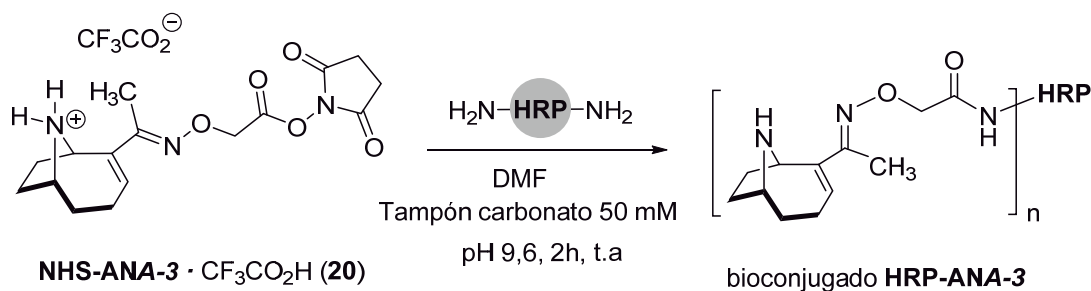


3.2. *Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-3 con BSA (BSA-ANA-3).* Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado BSA-ANA-1 a partir 200 μL de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-ANA-3 (20) y 1,8 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución y se almacenaron a -20 °C. El número de moléculas de (20) conjugadas por cada molécula de BSA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $n = 16$ (ver Tabla 1, entrada 4).



3.3. *Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-3 con OVA (OVA-ANA-3).* Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado OVA-ANA-1 a partir 100 μL de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-ANA-3 (20) y 1,9 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0,01% (v/v) y se almacenaron a -20 °C. El número de moléculas de (20) conjugadas

por cada molécula de OVA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $n = 7,9$ (ver Tabla 1, entrada 8).



3.4. Preparación de un bioconjugado del hapteno ANA-3 con HRP (HRP-ANA-3).

5 Preparado a partir de 100 μL de una disolución 5 mM del hapteno activado NHS-ANA-3 (20) en DMF y 0,9 mL de una disolución de HRP (2,5 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 7,4. Tras la purificación cromatográfica, las fracciones obtenidas conteniendo el bioconjugado se llevaron a concentraciones conocidas de entre 250–650 $\mu\text{g/mL}$ en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se

10 almacenaron a 4 °C. El número de moléculas de (20) conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $n = 2,5$ (ver Tabla 1, entrada 12).

2. Procedimiento ELISA

15 Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada anticuerpo se evaluó en los dos formatos clásicos de ELISA competitivo (el de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta y el de anticuerpo inmovilizado con detección directa) usando antígenos de ensayo homólogos, es decir, un antígeno de ensayo a partir del mismo bioconjugado de fórmula (I) que el utilizado para obtener el inmunógeno pero en el que

20 **P** = OVA o HRP. Después de cada etapa de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con una disolución de lavado, usando un lavador de 96 canales ELx405 (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.). La señal producida por la peroxidasa utilizada como marcador se reveló con 100 μL por pocillo de una disolución 2 mg/mL de *o*-fenilendiamina en tampón citrato 25 mM, fosfato 62 mM, pH 5,4, conteniendo

25 0,012% (v/v) de H_2O_2 . Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100 μL por pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. Al finalizar los ensayos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 492 nm usando una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de microplacas PowerWave HT (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.). Las curvas patrón sigmoideas obtenidas al

30 representar la absorbancia frente a la concentración de analito se ajustaron a una

ecuación logística de cuatro parámetros usando el paquete informático SigmaPlot de SPSS (Chicago, EE.UU.).

5 La afinidad del anticuerpo (IC_{50}) se estimó como la concentración de analito libre capaz de reducir a la mitad la señal máxima (A_{max}).

2.1. Ensayos ELISA competitivos en formato de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta (ensayo indirecto)

10 Las placas se tapizaron con 100 μ L por pocillo de una disolución de antígeno de ensayo que es un bioconjugado de formula (I) donde **P** es OVA, a 0,01 o a 0,1 μ g/mL en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6, mediante incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50 μ L por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50 μ L
15 por pocillo de un determinado anticuerpo diluido en PBST (0.05% Tween 20). La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. A continuación, cada pocillo recibió 100 μ L de una dilución 1/2000 de RAM-HRP (inmunoglobulinas de conejo anti-ratón marcadas con peroxidasa) en PBST. Esta reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 h.
20 Después de lavar las placas, se reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito anteriormente.

2.2. Ensayos ELISA competitivos en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa (ensayo directo)

25 Las placas se tapizaron con 100 μ L por pocillo de una dilución de anticuerpo en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50 μ L por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50 μ L por pocillo de una dilución concreta en PBST de bioconjugado enzimático que es un bioconjugado
30 de formula (I) donde **P** es HRP.

La misma distribución de reactivos se repitió para cada placa con un anticuerpo diferente. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura
35 ambiente y después se lavaron las placas. Finalmente, se reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito.

3. Producción de anticuerpos monoclonales de ratón

3.1. Inmunización de ratones

5

Para la inmunización se emplearon los bioconjugados de fórmula (I) en los que **P** es BSA (conjugados inmunizantes) obtenidos en los ejemplos anteriores. Se utilizaron hembras de ratón BALB/c, con una edad al inicio del proceso comprendida entre 6 y 8 semanas.

10

En cada dosis se administraron por vía intraperitoneal 100 µg de bioconjugado por ratón, siendo el volumen total administrado 200 µL. En la primera inmunización se suministró el bioconjugado en una emulsión preparada con adyuvante de Freund completo (1:1, v/v). A intervalos de 3 semanas, los ratones recibieron dos
15 inmunizaciones adicionales, en estos casos emulsionando los bioconjugados con adyuvante de Freund incompleto. Cuatro días antes de cada fusión celular, el ratón seleccionado recibió una última dosis de 100 µg del correspondiente bioconjugado diluido en PBS.

20

3.2. Fusiones celulares para la obtención de hibridomas

Las fusiones con los ratones inmunizados se llevaron a cabo básicamente siguiendo metodologías previamente descritas y bien establecidas en el estado de la técnica.

25

Inmediatamente después del sacrificio de los ratones se extrajo el bazo, que se homogeneizó con el émbolo de una jeringa estéril. Tras lisar los glóbulos rojos por choque osmótico con 1 mL de tampón de lisis durante un minuto en frío, los linfocitos se lavaron 2 veces con medio completo (con suero) frío y se filtraron para eliminar los coágulos formados.

30

La línea de mieloma P3-X63-Ag8.653 fue cultivada los días previos a la fusión en medio DMEM suplementado [2 mM L-alanina-L-glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales, 25 µg/mL gentamicina, suero bovino fetal (SBF) 10% (v/v)], manteniendo las células en fase de crecimiento exponencial, de manera que el día de la fusión se dispuso de un número suficiente de las mismas.

35

Tras dos lavados con medio sin suero, ambas poblaciones celulares se juntaron a una relación linfocito:mieloma 4:1. A continuación, las células se centrifugaron, para

inmediatamente después llevar a cabo la fusión celular. Para ello, se empleó el agente fusionante químico PEG1500 (1 mL por bazo, 1 min), que al disolver parcialmente las membranas permite la fusión de las células. Una vez fusionadas ambas poblaciones, las células se resuspendieron en medio DMEM suplementado [SBF 15% (v/v)] y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (100 µL por pocillo) a una densidad celular de 150×10^3 linfocitos por pocillo, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y un 95% de humedad. 24 h después de la fusión, se añadió 100 µL por pocillo de medio HAT para selección de hibridomas [DMEM suplementado con 100 µM hipoxantina, 0,4 µM aminopterina, 16 µM timidina, y SBF 20% (v/v)] que contenía HFCS (*High Fusion and Cloning Supplement*) al 1% (v/v).

3.3. Selección, clonaje y conservación de hibridomas

Aproximadamente 10–12 días después de la fusión celular se llevó a cabo la evaluación de los sobrenadantes de los pocillos sembrados, con objeto de identificar cuáles contenían hibridomas secretores de anticuerpos capaces de reconocer a anatoxina-a tanto en su forma conjugada como libre (clones competidores). Previamente, se determinó por inspección visual la eficiencia de la fusión, definida como el porcentaje de pocillos que presentaban al menos un clon claramente visible al microscopio.

Para llevar a cabo la identificación de clones competidores, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante la técnica ELISA diferencial, que consiste en analizar paralelamente en pocillos adyacentes cada sobrenadante en ausencia de analito y en presencia de una concentración prefijada de analito, habitualmente 100 nM. Para ello, las placas se tapizaron con el conjugado homólogo, que es un bioconjugado de fórmula (I) en el que P es OVA, a una concentración de 0,1 µg/mL, y el ensayo se llevó a cabo añadiendo 50 µL del sobrenadante de cultivo. Las condiciones para el formato de ELISA indirecto se detallan en el apartado 2.1.

A continuación, se seleccionaron aquellos pocillos que contenían hibridomas productores de anticuerpos capaces de proporcionar una señal de absorbancia igual o superior a 0,5 en el ensayo en ausencia de anatoxina-a e inhibición de la señal igual o superior al 80% en el ensayo en presencia de anatoxina-a. Adicionalmente, para todos los pocillos positivos se llevó a cabo un segundo *screening* más exhaustivo en modo bidimensional competitivo con el fin de seleccionar con mayor seguridad los mejores hibridomas. Para ello, el sobrenadante de cada hibridoma se ensayó a 4 diluciones

(1/8, 1/32, 1/128 y 1/512) en placas tapizadas con el bioconjugado homólogo a 0,01 y 0,1 µg/ml, y utilizando como competidor anatoxina-a a 5 y 50 nM (en ensayo). Así, 200 µL del sobrenadante de cultivo se diluyeron en 600 µL de PBST y las siguientes diluciones se hicieron de forma seriada a partir de esta primera. El ensayo se realizó
5 añadiendo 50 µL por pocillo de la correspondiente dilución de sobrenadante y 50 µL de la disolución de anatoxina-a en PBS a la concentración de 100, 10 y 0 nM.

Las células de los pocillos finalmente seleccionados se clonaron por el método de dilución límite, sembrando a partir de cada pocillo una nueva placa de 96 pocillos a
10 2 células por pocillo en medio HT, de igual composición que el HAT pero sin aminopterina, y conteniendo HFCS al 1% (v/v).

Generalmente, 7-10 días después del primer clonaje, se identificaron por inspección visual los pocillos que contenían un único clon, evaluándose de nuevo el sobrenadante
15 de cultivo de la misma forma que se ha descrito previamente para los sobrenadantes de fusión. Este proceso se realizó tantas veces como fue necesario (al menos dos) para asegurar la monoclonalidad de los hibridomas seleccionados, así como su estabilidad. Finalmente, se procedió a la expansión de las líneas celulares seleccionadas, cultivando progresivamente el hibridoma en recipientes de mayor
20 volumen. Una vez crecido el clon, las células se congelaron en nitrógeno líquido a una concentración de 10^7 células por vial (2-4 viales para cada hibridoma) en una disolución de SBF con DMSO 10% (v/v) como agente crioprotector. Los viales se mantuvieron a -80 °C en el interior de una caja de poliestireno durante 24 h antes de
pasarlos al contenedor de nitrógeno líquido.

25

3.4. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales

En la última fase de la expansión celular de los hibridomas, éstos se dividieron progresivamente en placas de cultivo hasta alcanzarse un volumen final comprendido
30 entre 100 y 200 mL de sobrenadante. Se dejaron crecer las células hasta alcanzar la confluencia, y una vez agotados los nutrientes del medio de cultivo se procedió a recoger el contenido de las placas. El volumen recogido se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se precipitó mediante la adición de un volumen de una disolución saturada de sulfato amónico, manteniéndose a 4 °C hasta su
35 purificación.

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad con columnas de proteína G siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este propósito, el anticuerpo precipitado se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm (4000×g) y se descartó el sobrenadante. El precipitado que contenía los anticuerpos se redisolvió con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,4 y se filtró con membranas de nitrocelulosa (diámetro de poro 0,45 µm) para eliminar partículas en suspensión. La elución del anticuerpo de la columna se realizó con tampón citrato sódico 100 mM, pH 2,5. Las fracciones que contenían el anticuerpo se identificaron mediante espectrofotometría UV y se recogieron. La disolución se neutralizó adicionando Tris-HCl 1 M, pH 9,5. Finalmente, se determinó por espectrofotometría UV la concentración del anticuerpo purificado [A_{280} (1 mg/mL IgG) = 1,4] y se preparó una disolución de trabajo a una concentración de 500 µg/mL en PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,01% (p/v), que se almacenó a 4 °C. La disolución restante se precipitó con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)], lo cual garantiza su estabilidad a 4 °C durante años.

15

4. Resultados

4.1. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a anatoxina-a

20

A partir de ratones inmunizados con bioconjugados de fórmula (I) es los que **P** es BSA, se llevaron a cabo fusiones celulares encaminadas a la generación de hibridomas. Los bioconjugados de fórmula (I) en los que **T** es **R-I** o **R-III** no fueron capaces de inducir la generación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales con una afinidad elevada hacia anatoxina-a. Por el contrario, a partir del bioconjugado de fórmula (I) en el que **T** es **R-II**, fue posible obtener 5 líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales con elevada afinidad hacia anatoxina-a. Los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de dichos hibridomas se han denominado a efectos de la presente invención y de los ejemplos aquí incluidos: mAb #38, mAb #44, mAb #325, mAb #417 y mAb #39. Este resultado pone de manifiesto que el bioconjugado de fórmula (I) más adecuado para obtener anticuerpos frente a anatoxina-a no es una cuestión evidente y obvia. Los resultados también demuestran la idoneidad de un bioconjugado de fórmula (I) en el que **T** es **R-II** para inducir la obtención de anticuerpos capaces de reconocer a anatoxina-a.

35

4.2. Determinación de la afinidad de los anticuerpos

Una vez purificados por afinidad los 5 anticuerpos monoclonales obtenidos (ver 4.1, anticuerpos mAb #38, mAb #44, mAb #325, mAb #417 y mAb #39), se determinó su afinidad hacia anatoxina-a mediante ELISA competitivo homólogo. En el formato indirecto (Fig. 6) los anticuerpos mostraron valores de IC_{50} para anatoxina-a comprendidos entre 3,15 nM y 11,00 nM. En el formato directo (Fig. 7) los anticuerpos mostraron valores de IC_{50} para anatoxina-a comprendidos entre 2,18 nM y 9,49 nM.

4.3. Determinación de la especificidad de los anticuerpos

10 La anatoxina-a existe químicamente en 2 formas enantioméricas. La cianotoxina natural es exclusivamente dextrógira (+), mientras que la forma levógira (-) se puede obtener por síntesis orgánica. Para comprobar hasta qué punto los anticuerpos monoclonales obtenidos eran realmente específicos, se ensayaron en el formato ELISA indirecto homólogo frente a los dos enantiómeros de la anatoxina-a. Como se
15 puede observar en la Fig. 8, todos los anticuerpos reconocieron a la (+)-anatoxina-a con una afinidad al menos 100 veces superior frente a la que mostraron para su enantiómero, la (-)-anatoxina-a. Este ensayo demuestra fehacientemente la enorme especificidad y capacidad de discriminación de los anticuerpos monoclonales descritos en esta invención, y su gran capacidad por tanto para determinar el enantiómero
20 natural de la anatoxina-a en muestras, incluso en presencia de otros posibles compuestos contaminantes.

REIVINDICACIONES

1. Un bioconjugado de fórmula (I):

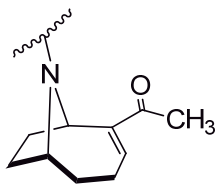


(I)

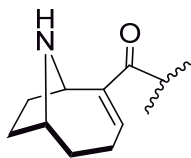
5

donde

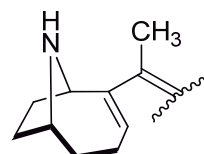
T se selecciona del grupo que consiste en R-I, R-II y R-III;



R-I



R-II



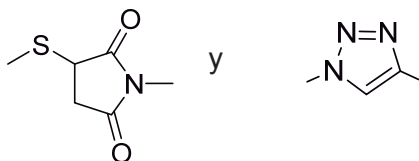
R-III

10

L es una cadena hidrocarbonada de 0 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

15

Z es un grupo funcional seleccionado entre $-(C=O)NH-$, $-NH(C=O)-$, $-(C=O)S-$, $-S(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-O(C=O)-$, $-O(C=O)O-$, $-O(S=O)O-$, $-O(SO_2)O-$, $-NH(S=O)O-$, $-O(S=O)NH-$, $-NH(SO_2)O-$, $-O(SO_2)NH-$, $-(SO_2)NH-$, $-NH(SO_2)-$, $-O(C=O)NH-$, $-NH(C=O)O-$, $-NH(C=O)NH-$, $-NH(C=S)NH-$, $-NH-$, $-N(\text{alquilo})-$, $-S-$, $-S-S-$, $-NH-NH-$, $-N=C-$, $-C=N-$, $-NH(C=NH)-$, $-N=N-$, $-O-$, $-CH=CH-$,



20

P es un péptido o polipéptido, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 daltons. El péptido o polipéptido P puede estar o no unido, mediante interacción covalente, electrostática o de otro tipo, a un soporte. Dicho soporte puede ser un polímero sintético o no, o estar compuesto por nanomateriales como nanotubos de carbono, zeolitas o sílice mesoporosa.

25

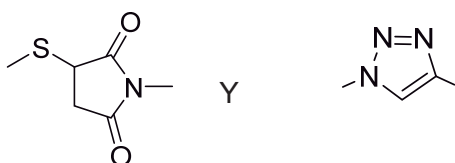
n es un número con un valor entre 1 y 500.

2. El bioconjugado de fórmula (I) según la reivindicación 1 caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

5

3. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en $-(C=O)NH-$, $-NH(C=O)-$, $-O(C=O)NH-$, $-NH(C=O)O-$, $-NH(C=O)NH-$, $-NH-$, $-S-$,

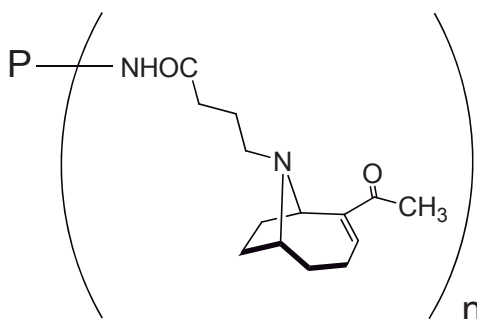
10



4. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, beta-galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

15

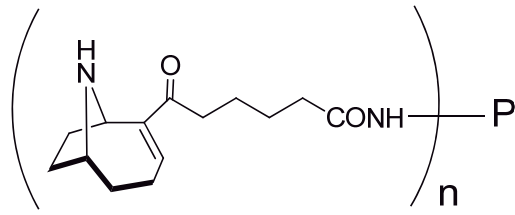
5. El bioconjugado de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con la fórmula (Ia)



(Ia)

20 donde **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

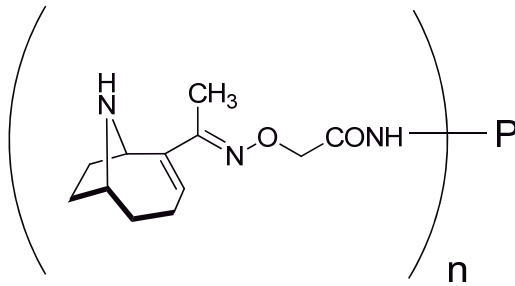
6. El bioconjugado de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con la fórmula (Ib)



(Ib)

donde **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

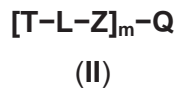
7. El bioconjugado de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con la fórmula (Ic)



(Ic)

donde **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

8. Un derivado marcado de formula (II):



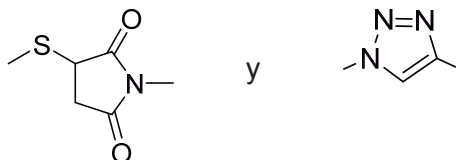
donde

T y **L** se han definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; **Z** se ha definido en las reivindicaciones 1 y 3; **Q** es un marcador no isotópico detectable y **m** es un número con un valor entre 1 y 1000.

9. El derivado marcado de formula (II) según la reivindicación 8, donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en enzimas, biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus

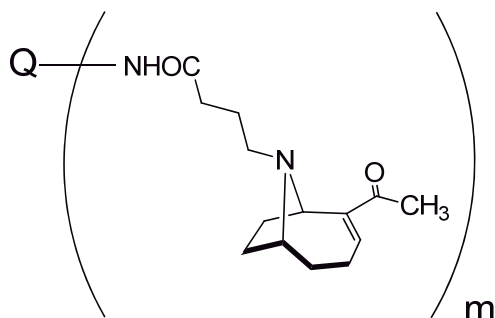
derivados, un éster de acridinio, nanopartículas cuánticas (en inglés *quantum dots*), y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

10. El derivado marcado de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en $-(C=O)NH-$, $-NH(C=O)-$, $-O(C=O)NH-$, $-NH(C=O)O-$, $-NH-$, $-S-$,



10

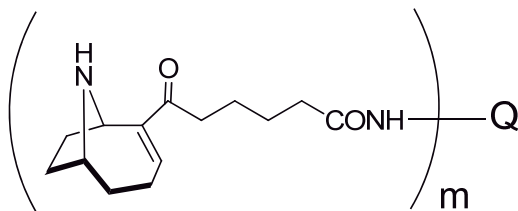
11. El derivado marcado de formula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, con la fórmula (IIa)



(IIa)

- 15 donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

12. El derivado marcado de formula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, con la fórmula (IIb)

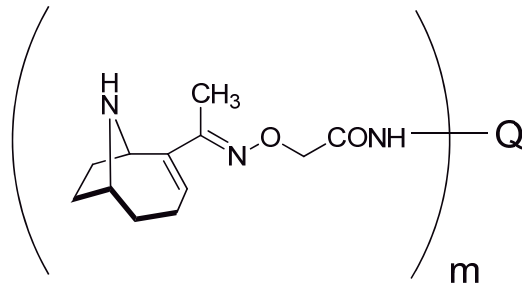


(IIb)

donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

25

13. El derivado marcado de fórmula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, con la fórmula (IIc)



5

(IIc)

donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

- 10 14. Un anticuerpo obtenido mediante la utilización de un bioconjugado según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

15. El anticuerpo según la reivindicación 14, donde el anticuerpo se selecciona entre monoclonal, policlonal y recombinante.

15

16. Método de análisis *in vitro* de anatoxina-a en una muestra que comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15;

20 b) incubar la muestra y el anticuerpo de la etapa (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica; y

c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).

25 17. Método según la reivindicación 16, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando como competidor un bioconjugado según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

30 18. Método según la reivindicación 16, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando

como competidor un derivado marcado según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.

- 5 19. Kit de detección y/o determinación de anatoxina-a, que comprende al menos un anticuerpo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 junto con un bioconjugado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o junto con un derivado marcado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.
- 10 20. Método de purificación y/o concentración de anatoxina-a de una muestra mediante cromatografía de afinidad que comprende las siguientes etapas:
- a) inmovilizar al menos un anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 sobre un soporte;
 - b) hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que retenga la anatoxina-a presente en dicha muestra; y
 - 15 c) eluir la anatoxina-a retenida en el soporte.

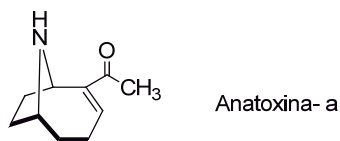


Fig. 1

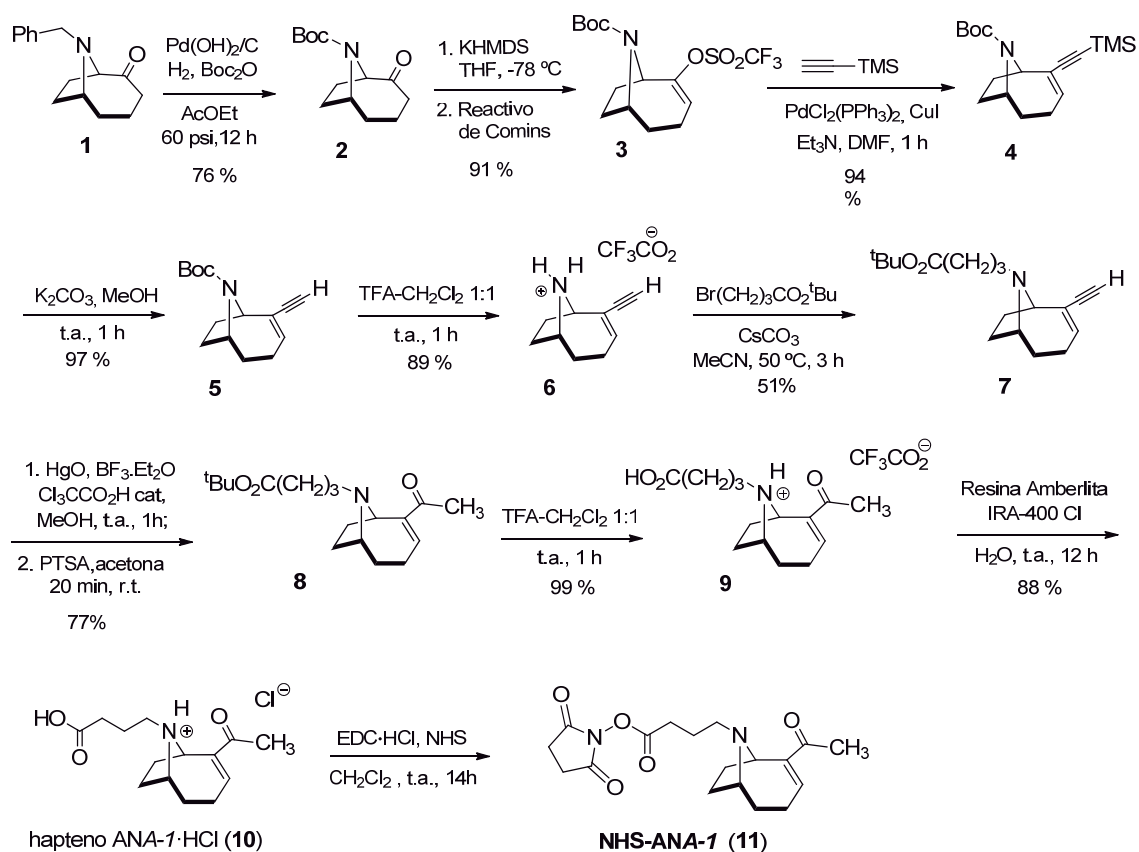


Fig. 2

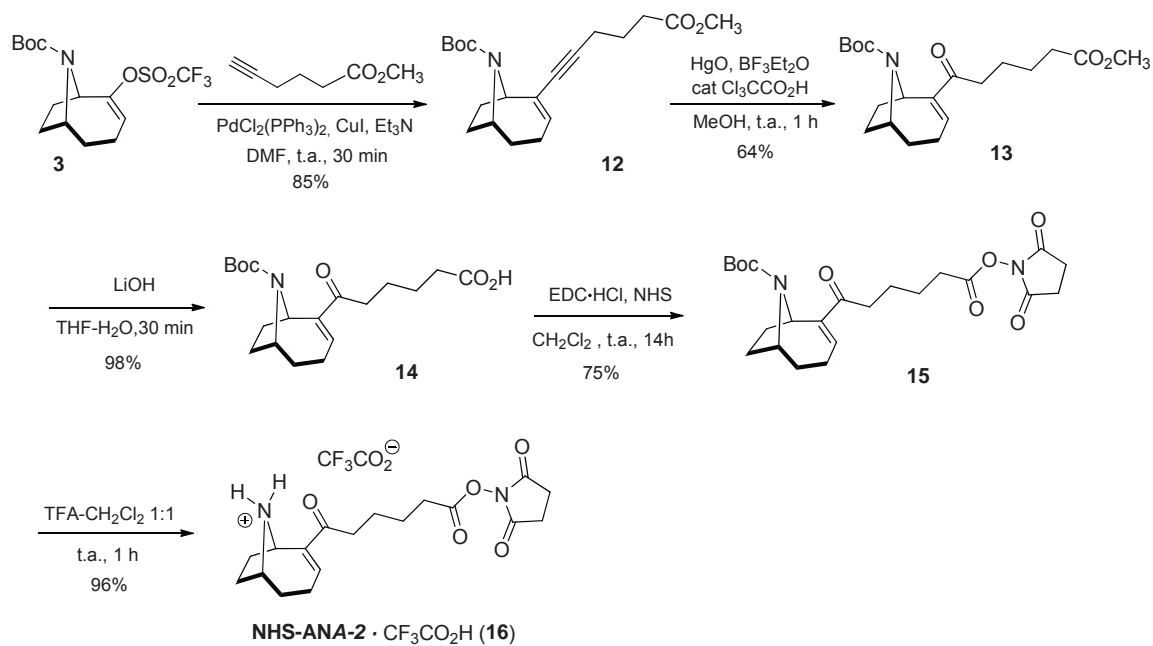


Fig. 3

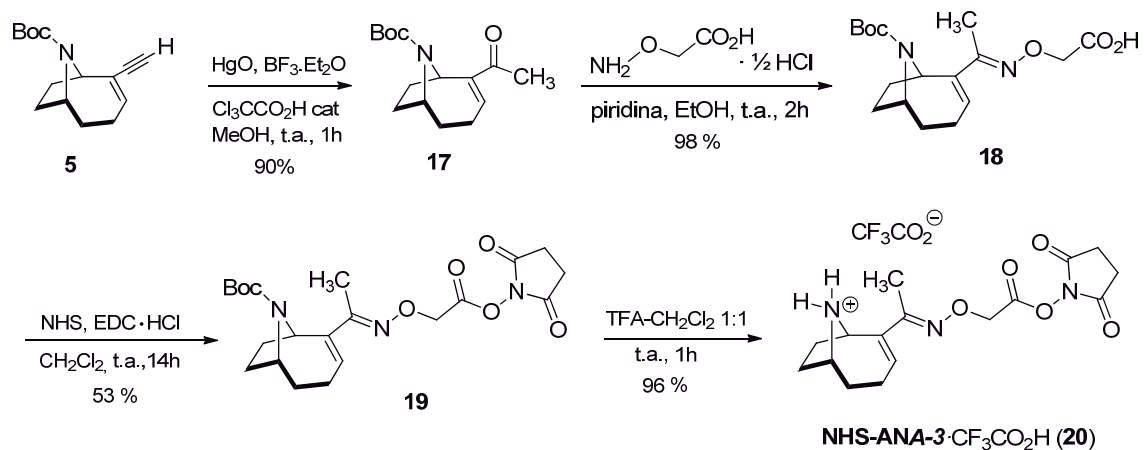


Fig. 4

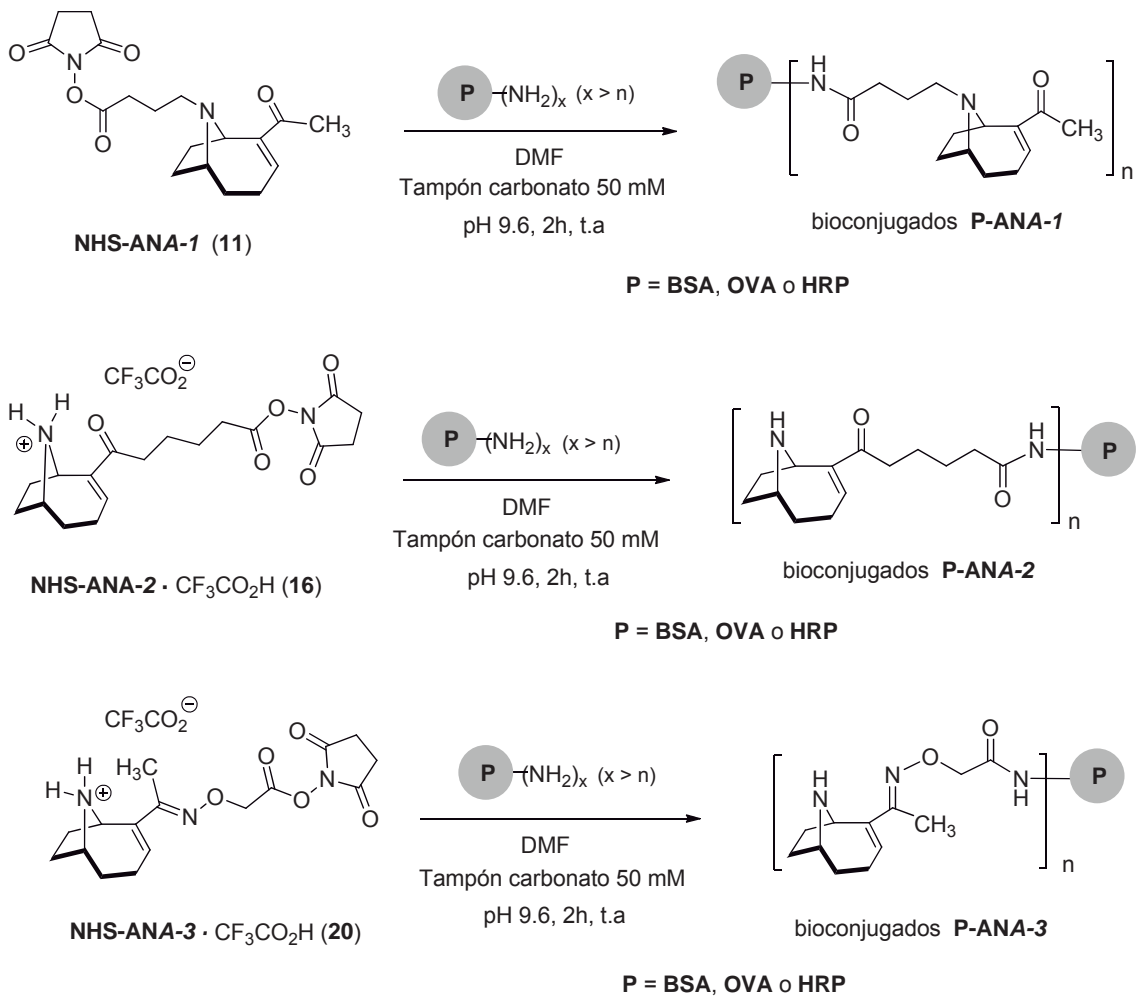


Fig. 5

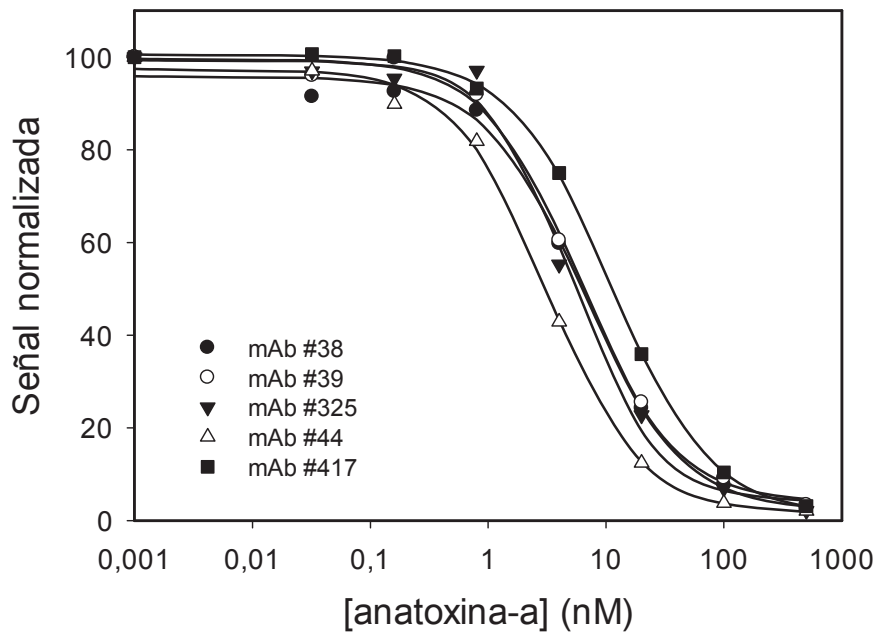


Fig. 6

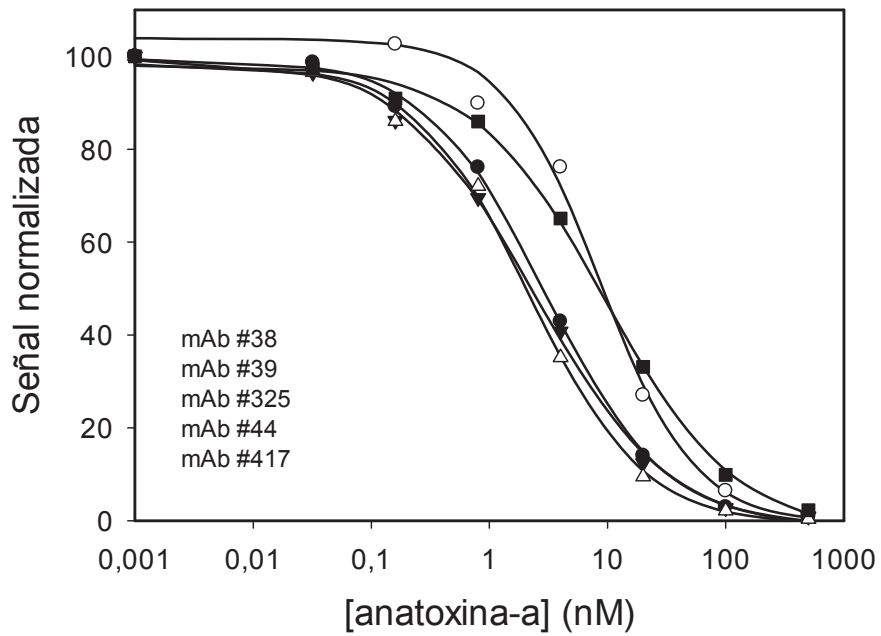


Fig. 7

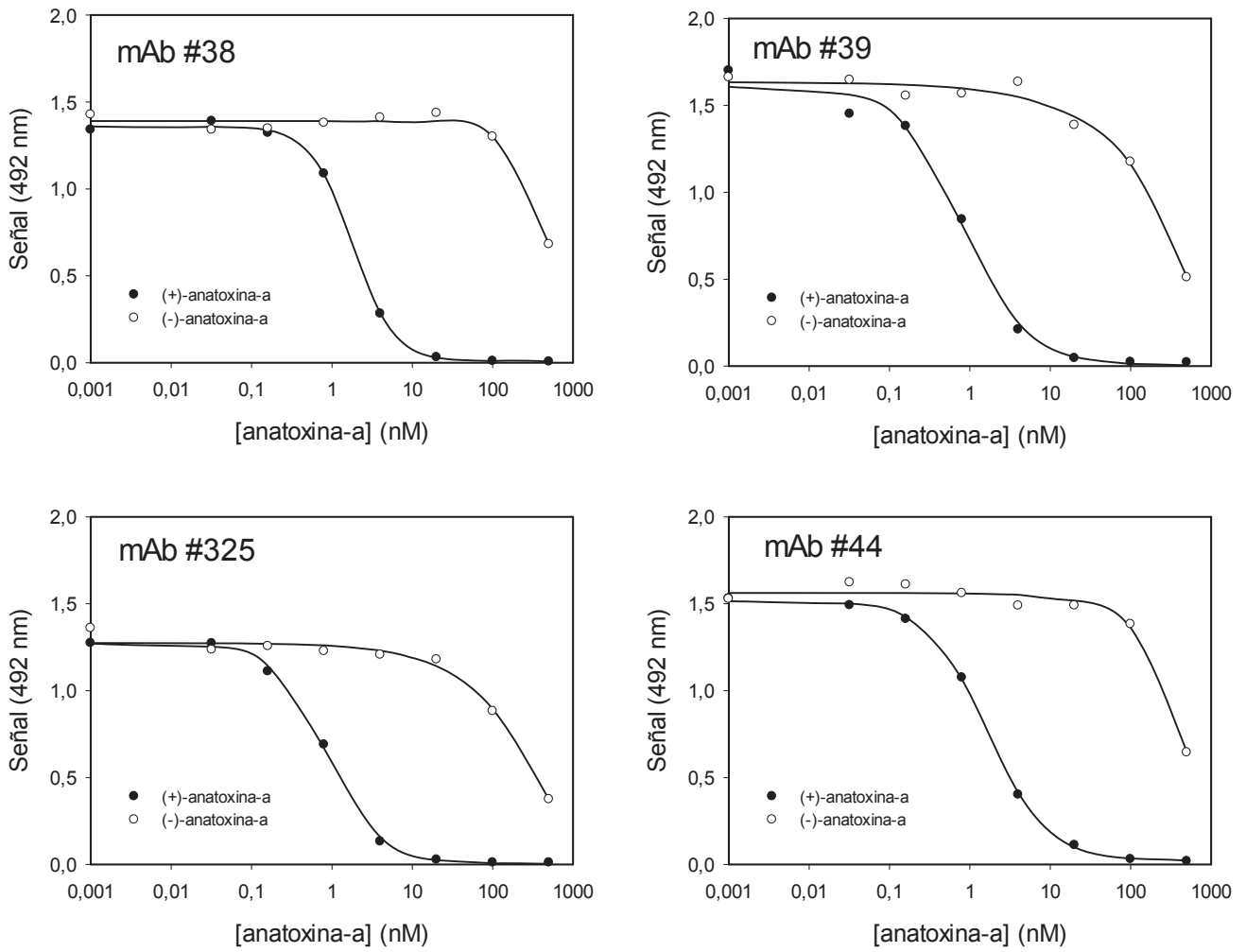


Fig. 8



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201531661

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.11.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MARC, M. et al. "Synthesis of a (+)-anatoxin-a analogue for monoclonal antibodies production". Tetrahedron Letters 2009, Volumen 50, páginas 4554-4557. [Disponible en línea el 29.05.2009]. doi: 10.1016/j.tetlet.2009.05.094. Ver página 4554, columnas 1 y 2; figura 1.	1-4,14-17,19,20
Y		8-10,18
Y	WO 2014/060623 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS & UNIVERSITAT DE VALÈNCIA) 24.04.2014, Página 1, líneas 6-10; página 12, líneas 8-26; página 13, líneas 12-23; reivindicaciones 29 y 31.	8-10,18
X	TOMBACCINI, D. et al. "Preparation of monoclonal antibodies to racemic anatoxin-a". FASEB Journal 1989, Volumen 3, Número 3, página A724.	1,2,4,14-17,19,20
A	AL-SAMMAK, M.A. et al. "Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin- α in environmental samples". Toxicon 2013, Volumen 76, páginas 316-325. [Disponible en línea el 16.10.2013]. Ver página 316, resumen; páginas 318-319, tabla 1.	1-20
A	JACKSON, G.W. et al. "Portable FRET Sensing of Proteins, Hormones, and Toxins Using DNA Apatamers and Quantum Dots". NSTI-Nanotech 2009, Volumen 2, páginas 205-208. Ver página 205, resumen; página 206, figura 2.	1-20
A	ROY-LACHAPPELLE, A. et al. "Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry". Analytical and Bioanalytical Chemistry 2015, Volumen 407, páginas 5487-5501. [Disponible en línea el 03.05.2015]. DOI: 10.1007/s00216-015-8722-2. Ver página 407, resumen.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.06.2017

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D451/00 (2006.01)

G01N33/531 (2006.01)

G01N33/533 (2006.01)

C07K16/00 (2006.01)

A01N43/46 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, G01N, C07K, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, NPL, EMBASE, REGISTRY, CAPLUS, PUBMED, GOOGLE SCHOLAR

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.06.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5-13, 17-20	SI
	Reivindicaciones 1-4, 14-16	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5-7, 11-13	SI
	Reivindicaciones 1-4, 8-10, 14-20	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MARC, M. et al. Tetrahedron Letters 2009, Vol. 50, pp. 4554-4557.	29.05.2009
D02	TOMBACCINI, D. et al. FASEB Journal, Vol. 3, Nº 3, pp. A724	00.00.1989
D03	WO 2014/060623 A1	24.04.2014

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un **bioconjugado** de fórmula (I) que comprende una unidad de **anatoxina-A**; un **derivado marcado** de fórmula (II) también derivado de anatoxina-A; un **anticuerpo** obtenido a partir de dicho conjugado; un **método de análisis** in vitro de anatoxina A que utiliza el anticuerpo; un **kit** de detección y/o determinación de anatoxina-A que comprende un anticuerpo junto a un bioconjugado o un derivado marcado; y un **método de purificación y/o purificación** de anatoxina-A mediante el anticuerpo anterior.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes 11/1986):

El documento D01 divulga un derivado de **anatoxina-A** que está incluido en la fórmula general I de la invención, cuando en ésta T es R-I, L es -N(CH₃)-(CH₂)₆-, Z es 1,2,3-triazol, n es 1 y P es una proteína, en concreto albúmina de suero bovino (ver página 4554, figura 1). Este derivado puede utilizarse para la producción de anticuerpos, que a su vez pueden ser útiles para el desarrollo de un ensayo de detección y cuantificación de anatoxina (ver página 4554, columnas 1 y 2).

Por tanto, el objeto de las reivindicaciones **1-4, 14-16** no es nuevo a la luz de lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga un derivado de **anatoxina-A** que comprende una unidad de anatoxina A (T, en concreto R-I, en la fórmula general I de la invención) unida a través del N a una cadena hidrocarbonada de 5 átomos de carbono (L en la fórmula I de la invención), que a su vez se une a albúmina (P en la fórmula I de la invención). El documento divulga la preparación de anticuerpos monoclonales frente a anatoxina-a, con aplicación para desarrollar un ensayo de esta toxina.

Aunque el documento no recoge explícitamente cuál es el grupo funcional (Z en la fórmula general I de la invención) que sirve de enlace entre la cadena hidrocarbonada L y la albúmina, esta unión se realiza por reacción entre el grupo funcional aldehído de la molécula de glutaraldehído que se utiliza como precursor de la cadena L y un grupo funcional presente en la albúmina. Se considera que esta unión debe realizarse a través de una de las numerosas posibilidades recogidas en la reivindicación 1 respecto a la naturaleza de los grupos de enlace Z, obtenidos por combinación de los distintos grupos funcionales comunes en química orgánica.

Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 2, 4, 14-16** no presenta novedad según lo divulgado en el documento D02.

Actividad inventiva (Artículo 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986):

La reivindicación dependiente **17** se refiere a la realización de un ensayo competitivo durante de una de las etapas del método de análisis de análisis de anatoxina-a de la invención.

Aunque los documentos D01 y D02 no divulgan explícitamente esta característica técnica no es posible reconocer para ella actividad inventiva, ya que se considera que constituye una alternativa evidente para el experto en la materia del campo al que pertenece la invención y, como tal, se encuentra recogida en diversos documentos del estado de la técnica (ver, por ejemplo, documento D03, reivindicación 29).

Del mismo modo, se considera que la reivindicación independiente **19**, relativa a un **kit** para la detección y/o determinación de la anatoxina-a que comprende el anticuerpo de la invención junto al bioconjugado de fórmula (I) o al derivado marcado de fórmula (II), carece de actividad inventiva respecto a lo divulgado en cada uno de los documentos D01 y D02, teniendo en cuenta además que existen en el estado de la técnica numerosos ejemplos de kits de detección de compuestos químicos basados en tecnologías de inmunoensayos que utilizan anticuerpos que reconocen específicamente dichos compuestos (ver, por ejemplo, D03, reivindicación 31).

Por otro lado, la reivindicación **20** se refiere a un **método de purificación y/o concentración** de anatoxina-a de una muestra mediante cromatografía de afinidad que comprende inmovilizar el anticuerpo de la invención sobre un soporte y hacer pasar la muestra sobre éste para que la anatoxina quede retenido. Se considera que, el experto en la materia, a la luz de lo divulgado en los documentos D01 y D02, tomados por separado, se plantearía la aplicación del inmunoensayo objeto de la invención para la purificación y/o concentración de anatoxina-a de una muestra, sin requerir el ejercicio de actividad inventiva por su parte.

Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **17, 19, 20** no presenta actividad inventiva a la luz de lo divulgado en cada uno de los documentos D01 y D02 tomados por separado.

La reivindicación independiente **8** se refiere a un derivado de anatoxina-a de fórmula (II) **marcado** con un marcador no isotópico detectable. La diferencia existente entre el compuesto divulgado en el documento D01 y el compuesto **II** de la invención es que en éste el ligando L se encuentra unido a un marcador no isotópico, en lugar de a una proteína.

El problema técnico que subyace en la invención es la provisión de un derivado de anatoxina-a alternativo a los disponibles en el estado de la técnica y útil como antígeno de ensayo frente a anatoxina-a. Sin embargo, ya existen en el estado de la técnica derivados marcados de toxinas que se han utilizado para la producción de anticuerpos a su vez útiles en métodos de detección de dichas toxinas.

El documento D03 divulga conjugados y derivados marcados de fludioxonil de fórmula (III), [T-L-Z]_m-Q (ver página 1, líneas 6-10), siendo Q un marcador no isotópico, como es biotina, fluoresceína, un fluoróforo de cianina, rodamina, o cumarina, nanopartículas cuánticas, etc. (ver página 13, líneas 12-23). El documento divulga también los anticuerpos para fludioxonil, así como un método de análisis de este compuesto utilizando dichos anticuerpos (ver página 1, líneas 6-10; página 12, líneas 8-26).

Se considera que el experto en la materia, a la luz de lo divulgado en el documento D03 se plantearía, con razonables expectativas de éxito, la sustitución de la albúmina presente en el derivado divulgado en el documento D01 por un marcador isotópico como los divulgados en el documento D03.

Por consiguiente, se considera que el objeto de las reivindicaciones **8-10, 18** carece de actividad inventiva respecto a la combinación de las enseñanzas técnicas recogidas en los documentos D01 y D03.

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención objeto de las reivindicaciones **5-7**, que se refieren a bioconjugados de fórmulas concretas Ia, Ib y Ic; ni hacia las reivindicaciones **11-13**, relativas a los derivados marcados de fórmulas IIa, IIb y IIc.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **5-7, 11-13** reúne los requisitos de patentabilidad (novedad, actividad inventiva y aplicación industrial) establecidos en el Artículo 4.1 de la Ley de Patentes 11/1986.