

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 201**

21 Número de solicitud: 202230811

51 Int. Cl.:

**C07D 311/80** (2006.01)

**C07K 1/113** (2006.01)

**C07K 14/77** (2006.01)

**C07K 14/765** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.09.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.04.2024**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (54.0%)**

**Avda. Blasco Ibáñez 13**

**46010 València (Valencia) ES y**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (46.0%)**

72 Inventor/es:

**MERCADER BADIA, Josep Vicent;**

**ABAD FUENTES, Antonio;**

**ABAD SOMOVILLA, Antonio;**

**AGULLÓ BLANES, Consuelo y**

**ADDANTE MOYA, Luis Guillermo**

74 Agente/Representante:

**CUETO PRIEDE, Sénida Remedios**

54 Título: **COMPUESTOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE ALTERNARIOL**

57 Resumen:

Compuestos y anticuerpos para la inmunodetección de alternariol.

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

ES 2 966 201 A1

## DESCRIPCIÓN

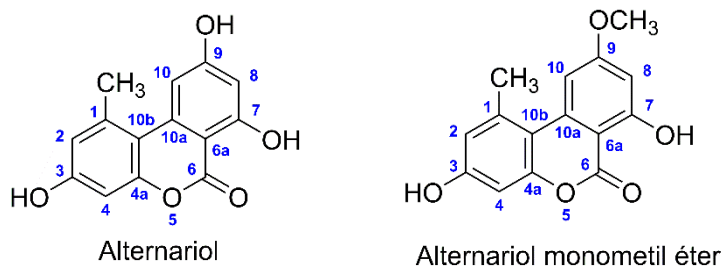
### COMPUESTOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE ALTERNARIOL

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

### ESTADO DE LA TÉCNICA

15 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. La clase de biotoxinas más frecuentemente detectadas en  
alimentos son las producidas por hongos, o micotoxinas. Particularmente, alternariol es  
20 uno de los metabolitos secundarios tóxicos más importantes producidos por hongos del  
género *Alternaria*. Pertenece al grupo de las micotoxinas con un esqueleto químico de  
benzocromenona tricíclica. Además, este compuesto contiene grupos hidroxilo, metilo y  
otros sustituyentes en su estructura química. Con frecuencia, esta micotoxina se  
encuentra en las muestras junto con otro metabolito de *Alternaria*, el alternariol  
25 monometil éter, ya que comparten la mayor parte de su ruta biosintética. En cuanto a su  
toxicidad, alternariol parece ser responsable de ciertos efectos teratogénicos  
observados en animales. También se ha demostrado que inhibe *in vitro* la actividad  
catalítica de la topoisomerasa, lo que puede estar asociado con el cáncer de colon y de  
esófago en humanos. Alternariol ha sido detectado en una amplia variedad de productos  
30 alimenticios, como lentejas, zanahorias, tomates, bayas, manzanas, peras, cerveza,  
vinos, jugos y varios cereales y harinas. Para evaluar el nivel de peligro relativo de estas  
toxinas para la salud humana, el Panel CONTAM de la Comisión Europea estableció

como parámetro de referencia un umbral de preocupación toxicológica (TTC (Toxicologic Threshold Concern, de sus siglas en inglés) para alternariol en adultos de 2,5 ng/kg de peso corporal por día (<https://www.efsa.europa.eu/en/publications>). Con los datos limitados de que se dispone, una encuesta alemana de 2016 concluyó que el porcentaje de TTC alcanzado por la exposición diaria promedio de un adulto es de 1400% (S. Hickert et al., *Mycotoxin Res.* **2016**, 32, 7–18).



Sorprendentemente, no existen regulaciones internacionales específicas para ninguna de las micotoxinas de *Alternaria*, y los datos disponibles sobre toxicidad, presencia y exposición dietética aún son limitados. En 2011, la EFSA llevó a cabo la primera evaluación del riesgo de estas micotoxinas para la salud humana y animal, basada en datos gubernamentales y publicados. Más recientemente, EFSA realizó un estudio sobre la exposición dietética de los consumidores europeos a las toxinas de *Alternaria*. En este estudio se encontró que el 8% de estas micotoxinas están presentes en los alimentos, siendo los bebés y otros niños el grupo de población más expuesta, y las frutas y los productos a base de frutas los que más contribuyen a la exposición dietética. Por lo tanto, se espera que la Comisión Europea establezca pronto niveles máximos para las micotoxinas de *Alternaria* más comunes en los alimentos.

Las técnicas analíticas para la determinación de alternariol en alimentos son fundamentalmente de dos tipos: cromatográficas y de reconocimiento molecular. Entre las primeras, la que goza de más aceptación actualmente es HPLC-MS/MS, mientras que entre las segundas la mayoría emplea anticuerpos como elemento de detección. Las técnicas cromatográficas constituyen la metodología de referencia, debido a su elevada sensibilidad, reproducibilidad y fundamentalmente por su capacidad de determinar varias micotoxinas simultáneamente. Por su parte, las técnicas basadas en la interacción anticuerpo-analito (inmunoensayos, cromatografía de afinidad, tiras inmunorreactivas) se consideran la mejor opción cuando es necesario realizar un elevado número de análisis en poco tiempo y/o en entornos poco dotados técnicamente.

De hecho, las micotoxinas constituyen probablemente el grupo de contaminantes en donde estos métodos rápidos inmunoquímicos han alcanzado un mayor grado de aceptación e implantación, existiendo un gran número de empresas de inmunodiagnóstico que comercializan ensayos tipo kit para la detección de estos  
5 contaminantes.

Los métodos inmunoanalíticos se basan en la unión selectiva, reversible y no covalente entre la sustancia a detectar (analito) y un anticuerpo que la reconoce específicamente. La micotoxina alternariol, debido a su bajo peso molecular, no es inmunogénica, y por tanto es incapaz de generar una respuesta inmunitaria por sí misma cuando se inyecta  
10 en un animal de experimentación. Para poder generar anticuerpos para alternariol es necesario acoplar covalentemente la molécula a una proteína, de forma que el conjugado obtenido sí resulte inmunogénico y permita la producción de anticuerpos frente a la micotoxina. Para conseguir obtener estos conjugados, a menudo es necesario recurrir al diseño y síntesis *ex novo* de un derivado, a través de estrategias que permitan  
15 la incorporación, en la posición deseada de la molécula, de una cadena hidrocarbonada con un grupo funcional terminal, respetando su estructura y grupos químicos característicos. Esta estrategia posibilita presentar la molécula al sistema inmunitario de la manera más adecuada para lograr anticuerpos de gran afinidad y especificidad.

Todos los anticuerpos generados hasta la fecha capaces de reconocer a alternariol se  
20 han obtenido empleando los grupos hidroxilo característicos de su estructura para la preparación de los conjugados inmunogénicos, utilizando química mediada por carbodiimida después de la carboximetilación no selectiva de los grupos hidroxilo (G. Singh et al., *Food Anal. Methods* **2018**, *11*, 1444–1450; C. Y. Yao et al., *Food Chem.* **2019**, *283*, 359–366), o bien uniendo directamente la micotoxina a la proteína portadora  
25 mediante una reacción tipo Mannich (Y. Ackermann et al., *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6360–6368; A. A. Burkin et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **2011**, *47*, 72–76). Ninguno de estos métodos permite controlar la posición de unión del esqueleto molecular de alternariol a las proteínas transportadoras, por lo que los anticuerpos en realidad se generan a partir de una mezcla indefinida de haptenos funcionalizados. Solo  
30 recientemente se ha descrito la producción de anticuerpos policlonales a partir de antígenos derivados de haptenos carboximetilados por posiciones hidroxílicas distales del esqueleto de alternariol, en los que la posición de conjugación está perfectamente definida (L. G. Addante-Moya et al., *Toxins* **2021**, *13*, 883). Los resultados obtenidos a

través de estas estrategias han sido muy variables y, en cualquier caso, no han  
conducido a la generación de anticuerpos con prestaciones adecuadas para su  
implementación en plataformas analíticas que permitan la cuantificación de alternariol  
en diferentes tipos de matrices alimentarias a los niveles de sensibilidad que sí alcanzan  
5 los sistemas analíticos basados en inmunoensayos desarrollados para la mayoría de las  
micotoxinas reguladas.

Existe por tanto la necesidad de obtener anticuerpos con características diferentes a las  
de los actualmente disponibles, adecuados no sólo para el desarrollo de inmunoensayos  
más sensibles y específicos, sino también para su implementación en nuevas  
10 plataformas analíticas basadas en tecnologías avanzadas, tales como biosensores de  
diferente tipo, ensayos multiplex y métodos basados en transferencia de energía por  
resonancia de fluorescencia (FRET). Estos anticuerpos mejorados obtenidos a partir de  
haptenos novedosos constituirán la base para desarrollar nuevos métodos  
inmunoanalíticos para la determinación, detección, concentración o extracción de  
15 alternariol, preferentemente mediante la utilización de un kit que pueda ser utilizado por  
la industria alimentaria, agrícola, clínica y/o medioambiental. Asimismo, los conjugados  
basados en haptenos funcionalizados a través de posiciones de la molécula de  
alternariol nunca antes exploradas pueden, en combinación con anticuerpos pre-  
existentes o generados a partir de aproximaciones convencionales, posibilitar el  
20 desarrollo de métodos inmunoanalíticos para alternariol con prestaciones superiores a  
los actualmente disponibles.

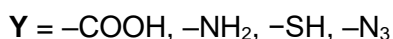
## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención aporta una solución a la limitada sensibilidad y especificidad de  
los actuales métodos inmunoanalíticos para la determinación de alternariol al  
25 proporcionar un método para la preparación de conjugados inmunogénicos y de ensayo  
en los que el hapteno acoplado a la proteína mantiene íntegra la estructura completa de  
alternariol con todos los grupos hidroxilo libres y por lo tanto disponibles para su  
reconocimiento por el sistema inmunitario durante la respuesta inmunitaria y, en  
consecuencia, por los anticuerpos generados a partir de la misma. El fundamento de la  
30 invención reside en el descubrimiento de la capacidad de los conjugados con el  
esqueleto tricíclico de alternariol acoplado a través de C-1, incorporando previamente a  
dicha posición un brazo espaciador de longitud y características estructurales diversas,

de inducir una respuesta inmunitaria muy eficaz que conduce a la generación de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia esta micotoxina, lo que posibilita el desarrollo de procedimientos de inmunodetección de alternariol con superiores prestaciones analíticas.

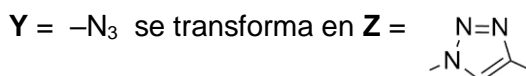
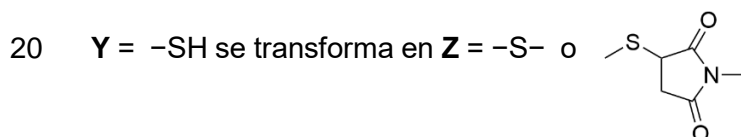
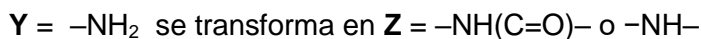
- 5 La presente invención proporciona conjugados de análogos de alternariol y derivados marcados de análogos de alternariol y su uso como antígenos inmunogénicos y de ensayo en métodos inmunoanalíticos.

En esta memoria se entiende por "análogo de alternariol" un hapteno, definido como **T-L-Y**, pudiendo ser el grupo funcional **Y** uno de los cuatro grupos funcionales que se indican a continuación.



**T** y **L** tienen el significado que se indica a continuación para la fórmula (I).

- 15 Cada uno de estos grupos **Y** se transforma en el correspondiente grupo **Z** de los compuestos de fórmula (I), de fórmula (II) o de fórmula (III) tras la conjugación:

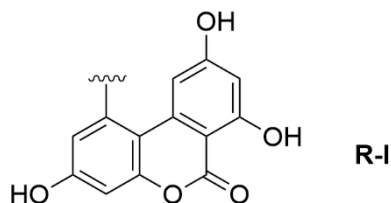


La presente invención se refiere a un compuesto que tiene una fórmula general (I)



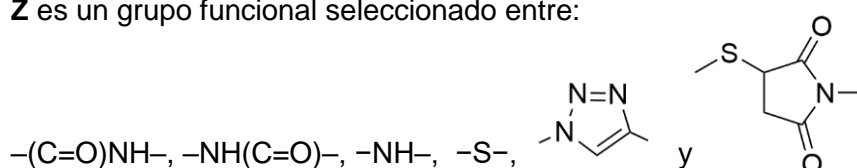
donde

**T** es **R-I**,



**L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 12 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende la sustitución de entre 0 y 6 átomos de carbono por heteroátomos, que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

**Z** es un grupo funcional seleccionado entre:



**m** es un número con un valor entre 1 y 100;

**X** está seleccionado entre **P** y **Q**, tal que

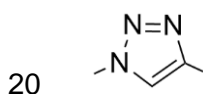
**P** es un péptido o polipéptido de naturaleza no enzimática, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 Dalton, que puede estar, o no, unido a un soporte, y

**Q** es un marcador no isotópico detectable.

15

**L** es preferiblemente una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 6 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en S y O.

En una realización preferida, **Z** se selecciona del grupo formado por  $-(C=O)NH-$ , y



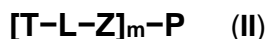
Más preferentemente, **Z** es  $-(C=O)NH-$ .

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 natural o sintético, o estar compuesto por nanomateriales, tales como nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

5 **m** es preferiblemente un valor entre 1 y 20.

En la presente memoria la palabra “compuesto” incluye todas las alternativas de la fórmula (I), la fórmula (II) o la fórmula (III) y equivale a la palabra “conjugado”.

Según realizaciones particulares de la presente invención, el compuesto es un conjugado de un análogo de alternariol de fórmula general (II), correspondiente a la  
 10 fórmula (I), en la que **X** es **P**:



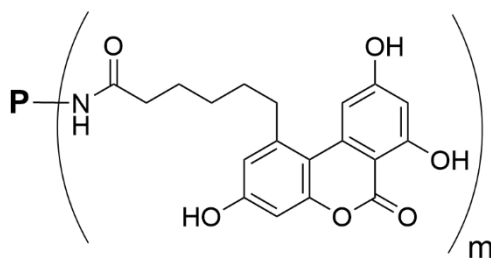
donde

**T, L, Z, P** y **m** tienen los mismos significados dados anteriormente.

El valor de **m** indica el grado de conjugación, es decir, la relación molar entre la fracción  
 15 derivada del fragmento **T-L-Z** y el péptido o polipéptido **P**, en el conjugado de fórmula (II) resultante.

Según una realización preferida de la presente invención, el conjugado de fórmula (II) se caracteriza porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina. Más preferiblemente, **P** es albúmina, que puede ser albúmina de huevo  
 20 o albúmina sérica.

Según otra realización preferida de la presente invención, el conjugado de fórmula (II) es un conjugado de fórmula (IIa)



(IIa)

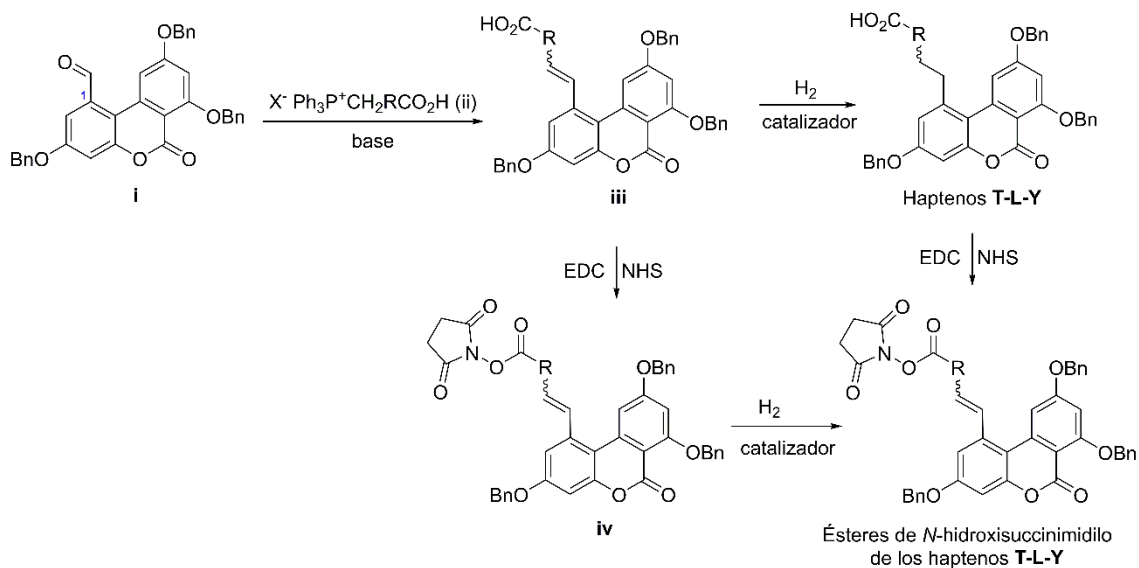


donde

**P** y **m** son como se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 20.

5 El conjugado de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar el análogo funcionalizado de alternariol de fórmula **T-L-Y** (hapteno), donde **T** y **L** se han definido anteriormente e **Y** es un grupo funcional seleccionado entre -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH y -N<sub>3</sub>, con **P**, un polipéptido natural o sintético de naturaleza no enzimática de peso molecular mayor de 2000 Dalton, por métodos ampliamente conocidos en la técnica (Greg T. Hermanson, Bioconjugate  
10 Techniques, 3ª Edición, Elsevier, Waltham, MA 02451, 2013).

Los análogos funcionalizados de alternariol de fórmula **T-L-Y** (haptenos), y los correspondientes ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo que se requieren para la preparación de los conjugados de fórmula (II), pueden prepararse a partir del compuesto **i** (Esquema 1), preparado por una secuencia sintética desarrollada por los autores y que se describe  
15 en los ejemplos, vía la conocida reacción de Wittig (<https://doi.org/10.1002/3527601880.ch1>) del grupo formilo de **i** con los iluros de fósforo derivado de la reacción de una base con una sal de fosfonio de fórmula X<sup>-</sup> Ph<sub>3</sub>P<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>RCO<sub>2</sub>H (**ii**) seguido de reacciones convencionales de hidrogenación y activación del grupo carboxilo. Las sales de fosfonio de fórmula X<sup>-</sup> Ph<sub>3</sub>P<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>RCO<sub>2</sub>H (**ii**),  
20 en la que el anión X<sup>-</sup> es cloruro, bromuro o yoduro y R es una cadena hidrocarbonada de 0 a 11 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende la sustitución de entre 0 y 6 átomos de carbono por heteroátomos, que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N, pueden prepararse a partir del correspondiente haluro, XCH<sub>2</sub>RCO<sub>2</sub>H, por reacción  
25 con trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) por métodos ampliamente conocidos en síntesis orgánica, según, por ejemplo, H. J. Cristau, F. Plénat. Preparation, Properties and Reactions of Phosphonium Salts, en "Organophosphorus Compounds", Ed. Frank R. Hartley, 1993, capítulo 2, páginas.45-183 (<https://doi.org/10.1002/047003436X.ch2>; EP0675130A2; EP95104547B1).



**Esquema 1.**

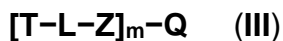
Esquema general para la preparación de haptenos de fórmula **T-L-Y** y los correspondientes ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo

5

El conjugado de fórmula **(II)** de la presente invención puede utilizarse para la producción de anticuerpos, o como antígeno de ensayo junto con un anticuerpo de alternariol para determinar o detectar esta micotoxina en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo.

- 10 En otra realización de la presente invención, **X** es un marcador no isotópico **Q** en lugar del péptido **P** de la fórmula **(II)** como material portador del análogo funcionalizado de alternariol **T-L-Y** definido anteriormente. Cuando el material portador es un marcador no isotópico detectable, el derivado del análogo de alternariol es un compuesto de fórmula **(III)**:

15



donde **T**, **L**, **Z**, **Q** y **m** tienen el mismo significado definido anteriormente.

**Q** es un marcador no isotópico detectable.

"Detectable" significa que el marcador puede ser detectado por una técnica analítica o por el ojo humano, o ambos modos.

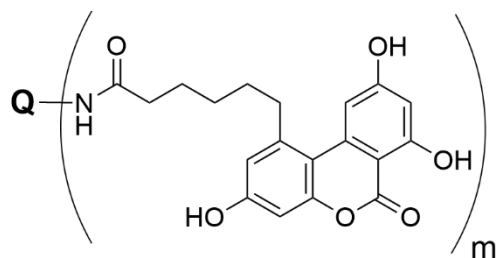
En la presente invención se entiende por “marcador” cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica analítica. En la presente invención, **Q** identifica un fragmento de una molécula, o una molécula química detectora, marcadora o trazadora no isotópica.

- 5 En una realización preferida, **Q** está seleccionado entre: una enzima, biotina, un compuesto luminiscente, un fluoróforo, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta. Preferentemente, **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína, 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
- 10 de acridinio, nanopartículas cuánticas (en inglés *quantum dots*), y nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

Una enzima se entiende en la presente memoria como una proteína, péptido o polipéptido, que actúa como catalizador de reacciones bioquímicas.

- 15 Un sistema de detección indirecta es un sistema que no mide directamente el parámetro deseado, sino que se obtiene su valor a través de las medidas de un parámetro distinto.

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



(IIIa)

- 20 donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, fosfatasa, oxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas de oro coloidal, carbón o látex, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

- El derivado marcado de fórmula (III) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un análogo funcionalizado de alternariol
- 25 de fórmula **T-L-Y** (hapteno), donde **T**, **L** e **Y** se han definido anteriormente, con **Q**, un marcador no isotópico, por métodos ampliamente conocidos en la técnica (Greg T.

Hermanson, Bioconjugate Techniques, 3ª Edición, Elsevierx, Waltham, MA 02451, 2013).

Este compuesto de fórmula (III) puede utilizarse junto con un anticuerpo de alternariol para determinar o detectar esta micotoxina en una muestra mediante la tecnología de  
5 inmunoensayo.

Para obtener anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia alternariol, así como para desarrollar inmunoensayos para analizar dicha micotoxina, se han preparado análogos funcionalizados de alternariol (haptenos), es decir, análogos estructurales de esta molécula que incorporan un grupo funcional susceptible de ser utilizado para la  
10 conjugación a un portador **P** o marcador **Q**. Este grupo funcional está separado del sistema tricíclico de la molécula de alternariol por un espaciador **L**. La posición de incorporación del grupo funcional a la estructura de alternariol para la conjugación no es un aspecto obvio y puede ser determinante para la viabilidad de los conjugados de fórmula (II) como inductores de la producción de anticuerpos de afinidad y especificidad  
15 adecuadas frente a alternariol, e incluso para la viabilidad de los conjugados de fórmula (II) o de derivados marcados de fórmula (III) para actuar como moléculas competidoras que permitan el desarrollo de inmunoensayos sensibles y específicos para dicha micotoxina.

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

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un anticuerpo (a partir de ahora anticuerpo de la invención) generado en respuesta a un conjugado de la invención, en particular al conjugado de fórmula (II). Más preferiblemente los anticuerpos  
25 son generados en respuesta al conjugado de fórmula (IIa).

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso del conjugado anteriormente descrito de fórmula (II) para la obtención de anticuerpos.

Un nuevo aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo que reconoce el conjugado de fórmula (II) o el conjugado de fórmula (III).

En una realización particular, el anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o recombinante.

5 El procedimiento de obtención de los anticuerpos de la invención a partir de conjugados de la invención se puede llevar a cabo por métodos ampliamente conocidos en la técnica, como por ejemplo a partir de la inmunización de un animal. Los anticuerpos generados a partir de un conjugado de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales (o antisueros), anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos de la invención tienen alta afinidad y especificidad hacia alternariol.

10 En una realización particular, la afinidad  $IC_{50}$  hacia el alternariol de los anticuerpos monoclonales o policlonales es inferior a 100 nM, preferentemente inferior a 50 nM, más preferentemente inferior a 10 nM, aún más preferentemente inferior a 5 nM, aún más preferentemente inferior a 2,5 nM y aún más preferentemente inferior a 1 nM y aún más preferentemente inferior a 0,4 nM.

15 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención presentan unos valores de afinidad  $IC_{50}$  hacia el alternariol inferiores a los anticuerpos policlonales.

El término “antisuero” se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno, y es otra manera de denominar a un anticuerpo policlonal.

20 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método de análisis *in vitro* de alternariol en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo. Preferiblemente, este método comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo de la invención;
- 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
- 25 c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).

30 El método de la presente invención permite la determinación cuantitativa o análisis cualitativo del contenido de la micotoxina alternariol en una muestra. Asimismo, el método de la presente invención permite analizar el contenido de alternariol en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de alimentos, como cereales, frutas

y vinos, 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 alternariol en cereales y sus derivados, así como en frutas, hortalizas y sus derivados.

- 5 Según una realización preferida, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un conjugado de fórmula (II) o un derivado marcado de fórmula (III). Preferentemente, el inmunoensayo competitivo es de tipo ELISA o inmunocromatográfico.

10 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.

15 Un aspecto adicional de la presente invención también se refiere a un kit de detección de alternariol que utiliza al menos un anticuerpo de la invención. Adicionalmente, el kit de detección de alternariol puede comprender un conjugado de fórmula (II) o un derivado marcado de fórmula (III) tal como se describen en la presente solicitud de patente.

20 Otro aspecto adicional de la presente invención también se refiere a un método de purificación y/o concentración de alternariol de una muestra que comprende el uso del anticuerpo anteriormente descrito. Particularmente, este método se basa 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 el alternariol presente en dicha muestra. La elución posterior del alternariol retenido 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. En una realización preferida, este método comprende las siguientes etapas:

- 30 a) inmovilizar al menos un anticuerpo obtenido a partir de conjugados de la invención sobre un soporte;
- b) hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que el anticuerpo retenga el alternariol presente en dicha muestra; y
- c) eluir el alternariol retenido por el anticuerpo en el soporte.

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 inmunitaria en un huésped. En la presente invención el inmunógeno es un conjugado de fórmula (II).

- 5 El término “antígeno” en esta solicitud de patente se refiere a una molécula capaz de interactuar 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.

- 10 En la presente memoria el término “antígeno de ensayo”, “antígeno enzimático” o “trazador” se refiere a un conjugado de fórmula (II) o a un derivado marcado de fórmula (III) que se utiliza en el ensayo competitivo.

- 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 análogos funcionalizados de alternariol (haptenos) y los correspondientes conjugados de fórmula (II) y (III), 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 conjugado de fórmula (II) y (III) para la producción de anticuerpos de afinidad y especificidad adecuadas hacia el analito, aptos para el desarrollo de un método inmunoanalítico eficaz.

## 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Fig. 1.** Curvas estándar para alternariol en el formato de ELISA competitivo homólogo indirecto obtenidas con el anticuerpo policlonal **la#2** producido a partir del conjugado BSA-AL-1.

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de los conjugados de fórmulas (II) y (III) para la obtención de anticuerpos frente a alternariol y el desarrollo de un inmunoensayo de elevada sensibilidad y selectividad para el mismo. 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.

### 10 1. Técnicas generales

1.1. Reactivos, equipos y técnicas generales utilizadas en la preparación de los haptenos y conjugados.

Los disolventes orgánicos se secaron y destilaron antes de su uso utilizando técnicas estándar. El tetrahidrofurano (THF) se destiló sobre Na y benzofenona en atmósfera de N<sub>2</sub> justo antes de usarse. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeCN se destilaron de CaH<sub>2</sub> de la misma manera. La *N,N*-dimetilformamida (DMF) se destiló de CaH<sub>2</sub> a 7 mm Hg y se almacenó a -20 °C sobre tamiz molecular de 4 Å. Los solventes y reactivos comerciales restantes se usaron sin purificación previa. Las reacciones se monitorizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílice pre-recubiertas (espesor de capa de 0,25 mm, gel de sílice 60 F254) usando luz UV como agente de visualización y ácido fosfomolibdico etanólico o soluciones acuosas de molibdato de amonio cérico y calor como agentes de desarrollo. Las purificaciones cromatográficas en columna se realizaron usando gel de sílice 60 (tamaño de partícula 0,043–0,063 mm). Los espectros de RMN se registraron con un espectrómetro Bruker DPX300 a 300 MHz (<sup>1</sup>H) y a 75 MHz (<sup>13</sup>C) y con un espectrómetro Bruker DRX 500 a 500 MHz (<sup>1</sup>H) y a 126 MHz (<sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm utilizando el solvente residual como referencia interna en todos los casos [(7,27 y 77,00), (2,05 y 29,84) y (3,58 y 67,57) ppm, para los espectros de (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) en CDCl<sub>3</sub>, acetona-d<sub>6</sub> y THF-d<sub>8</sub>, respectivamente]. Los grados de sustitución de carbono se establecieron mediante secuencias de pulsos DEPT. En la mayoría de los casos, se usó una combinación de experimentos COSY y HSQC para la asignación de desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se obtuvieron utilizando un equipo TripleTOF TM 5600 LC/MC/MC



System, de AB SCIEX (Nieuwerkerk aan den IJssel, Países Bajos), equipado con una fuente de electrospray. Los datos obtenidos se expresan como relación masa/carga ( $m/z$ ).

5 El análisis de los conjugados se realizó con un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo e ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF), modelo 5800 (ABSciex), en modo lineal positivo (1500 disparos para cada posición) en un rango de masa de 12.000–100.000  $m/z$ .

**1.2. Reactivos, equipos y técnicas generales utilizadas en la generación de anticuerpos e inmunoensayos.**

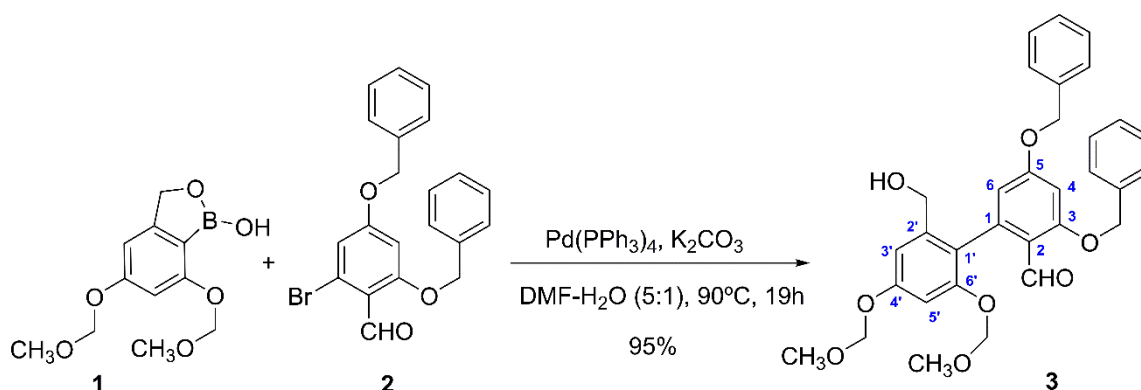
10 El alternariol y el alternariol monometil éter de referencia se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). La BSA (fracción V) fue de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). Sigma/Aldrich (Madrid, España) proporcionó OVA, HRP, suero bovino, y los adyuvantes de Freund. La 3,3',5,5'-tetrametilbencidina se adquirió de Zeulab (Zaragoza, España). Para la purificación de los conjugados de fórmula II y III se utilizaron columnas preempaquetadas de desalinización Sephadex G-25 HiTrap™ de GE Healthcare  
15 (Uppsala, Suecia) utilizando como tampón de elución fosfato sódico 100 mM, pH 7,4. Como anticuerpo secundario, se usó bien un anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de conejo (GAR–HRP) de Rockland Immunochemicals (Pottstown, PA, EE.UU.) o bien un anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de ratón (RAM–HRP) de Dako (Glostrup,  
20 Dinamarca). Se utilizaron placas Costar ELISA de poliestireno de 96 pocillos de alta adsorción y fondo plano de Corning (Corning, NY, EE. UU.). Las absorbancias de ELISA se leyeron con un PowerWave HT de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE.UU.). Los pocillos de microplacas se lavaron con un lavador de microplacas ELx405 también de BioTek Instruments.

25 **2. Preparación de conjugados de fórmula (II)**

**Ejemplo 1:** Preparación de conjugados de fórmula (II) para  $T = R-I$ ,  $L = CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$ ,  $Z = -(C=O)NH-$  y  $P = BSA$  (seroalbúmina bovina) y OVA (ovalbúmina).

30 **2.2. Preparación del éster de N-hidroxisuccinimidilo del hapteno AL-1 (NHS–AL-1).**

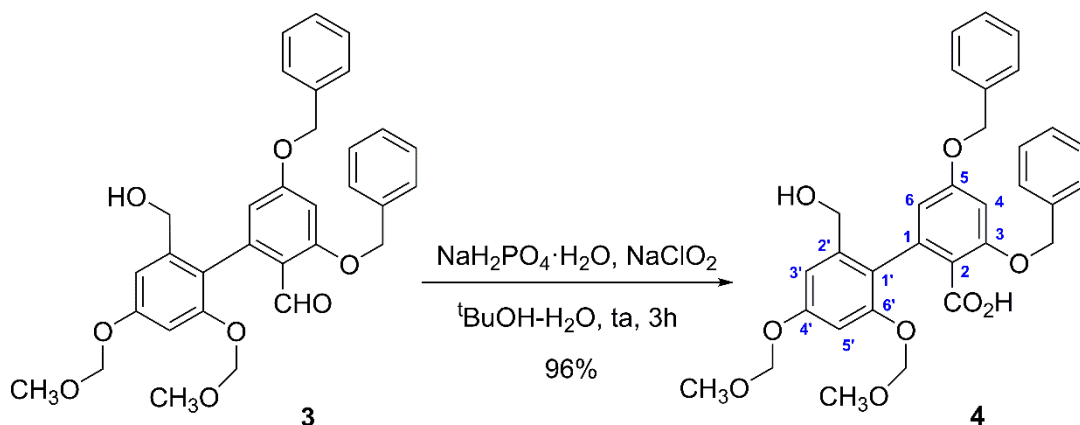
2.2.1. Preparación de 3,5-bis(benciloxi)-2'-(hidroximetil)-4',6'-bis(metoximetoxi)-[1,1'-bifenil]-2-carbaldehído (**3**).



Una mezcla del ácido borónico **1** (K. Mori et al., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 5633-5637) (120,4 mg, 0,474 mmol, 1,34 equiv), bromoaldehído **2** (T. Roedel y H. Gerlach, *Liebigs Ann.* **1995**, *5*, 885–888; L. G. Addante-Moya et al., *Toxins* **2021**, *13*, 883) (140,5 mg, 0,354 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (68,4 mg, 0,495 mmol, 1,4 equiv) y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (36,8 mg, 0,032 mmol, 0,09 equiv) en una mezcla 5:1 de DMF y agua milli-Q (1,3 mL), previamente desgasificada por ciclos de congelación-vacío-descongelación, se calentó a 90 °C durante toda la noche bajo nitrógeno. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con Et<sub>2</sub>O, las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, una solución acuosa al 1,5% de LiCl y salmuera y se secaron en MgSO<sub>4</sub> anhidro. El residuo que quedó después de la evaporación del disolvente a presión reducida se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando hexano-AcOEt 8:2 como eluyente, para dar el biarilcarbaldehído **3** (183,5 mg, 95%) como un aceite amarillento. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (en solución de CDCl<sub>3</sub> existe como un equilibrio entre las formas hidroxialdehído y lactol (M. Tamiya et al., *Synlett* **2007**, 780–784); solo se dan señales de la forma hidroxialdehídica) δ 10,18 (s, 1H, CHO), 7,48 (br d, *J* = 7,7 Hz, 2H, 2xCH Ph), 7,44–7,31 (m, 8H, 8xCH Ph), 6,91 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-3'), 6,80 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-5'), 6,67 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-4), 6,37 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-6), 5,23 y 5,20 (sistema AB, *J* = 6,8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5,20 y 5,17 (cada una s, cada una 2H, 2xOCH<sub>2</sub>Ph), 5,00 y 4,96. (sistema AB, *J* = 6,7 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4,31 (dd, *J* = 12,2, 4,7 Hz, 1H, CHOH), 4,25 (dd, *J* = 12,5, 7,0 Hz, 1H, CH'OH), 3,52 y 3,26 (cada una s, cada una 3H, 2xOCH<sub>3</sub>), 1,82 (dd, *J* = 7,0, 4,7 Hz, OH); RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>), solo se dan las señales de la forma hidroxialdehído, δ 190,3 (CHO), 163,4 (C-3), 162,8 (C-5), 158,1 (C-4'), 154,7 (C-6'), 141,8 (C-2'), 140,5 (C-1), 136,1 y 136,0 (2xC Ph), 128,9 (2xCH Ph), 128,8 (2xCH Ph), 128,5 (CH Ph), 128,3 (CH Ph), 127,6

(2xCH Ph), 127,4 (2xCH Ph), 122,7 (C-1'), 119,0 (C-2), 110,0 (CH-6), 108,9 (CH-3'), 103,1 (CH-5'), 100,1 (CH-4), 94,8 y 94,7 (2xOCH<sub>2</sub>O), 70,8 y 70,4 (2xOCH<sub>2</sub>Ph), 63,5 (CH<sub>2</sub>OH), 56,4 y 56,1 (2xOCH<sub>3</sub>).

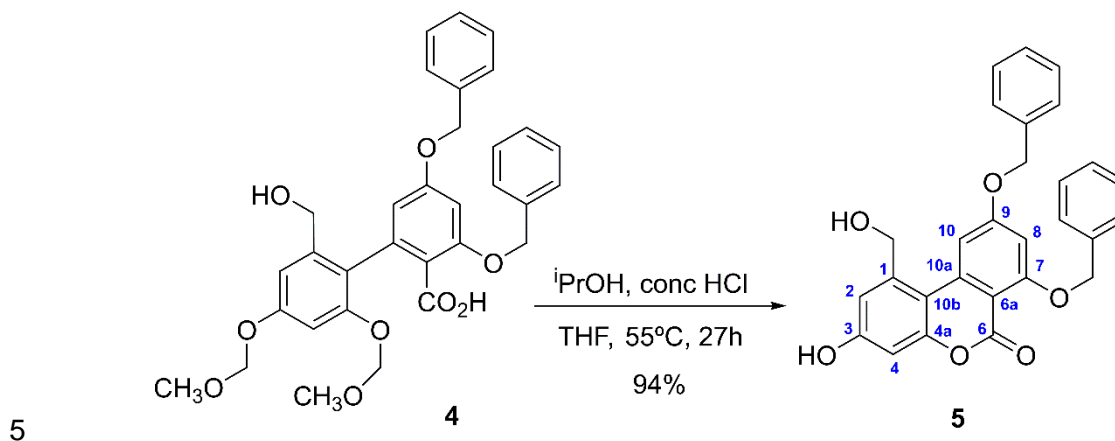
2.2.2. Preparación del ácido 3,5-bis(benciloxi)-2'-(hidroximetil)-4',6'-bis(metoximetoxi)-[1,1'-bifenil]-2-carboxílico (**4**).



NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (113,8 mg, 0,824 mmol, 2,8 equiv), 2-metilbut-2-eno (623 μL, 5,88 mmol, 20 equiv) y NaClO<sub>2</sub> (87,7 mg, 0,970 mmol, 3,3 equiv) se añadieron sucesivamente a una disolución del aldehído **3** (160,4 mg, 0,294 mmol) en una mezcla 5:1 de <sup>t</sup>BuOH-agua  
 10 (9,3 mL) a 0°C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas, luego se diluyó con una solución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. La purificación cromatográfica del producto crudo obtenido, usando mezclas de CHCl<sub>3</sub> y MeOH de 97:3 a 95:5 como eluyente, proporcionó el ácido  
 15 biarilcarboxílico **4** (158 mg, 96%) como un aceite amarillento viscoso. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,49–7,31 (m, 10H, 10xCH Ph), 6,86 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, H-3'), 6,80 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, H-5'), 6,68 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-4), 6,41 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-6), 5,21 y 5,16 (sistema AB, *J* = 6,8 Hz, cada una 1H, OCH<sub>2</sub>O), 5,17–5,14 (sistema AB parcialmente solapado con la señal a 5,16 ppm, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 5,05 (s ancho, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,99 (s  
 20 ancho, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 4,41 y 4,24 (cada una d, *J* = 11,7 Hz, cada una 1H, CH<sub>2</sub>OH), 3,50 y 3,23 (cada una s, cada una 3H, 2xOCH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,5 (CO<sub>2</sub>H), 160,9 (C-3), 158,2 (C-5), 157,5 (C-4'), 155,2 (C-6'), 140,2 (C-2'), 139,1 (C-1), 136,2 y 135,8 (2xC Ph), 128,9 (2xCH Ph), 128,8 (2xCH Ph), 128,5 (CH Ph), 128,4 (CH Ph), 127,7 (2xCH Ph), 127,6 (2xCH Ph), 123,5 (C-1'), 114,1 (C-2), 110,2 (CH-3'), 109,4 (CH-  
 25 6), 104,1 (CH-5'), 100,5 (CH-4), 95,4 y 94,7 (2xOCH<sub>2</sub>O), 71,3 y 70,4 (2xOCH<sub>2</sub>Ph), 63,7

(CH<sub>2</sub>OH), 56,4 y 56,1 (2xOCH<sub>3</sub>); HRMS (TOF, ES+) *m/z* calculado para C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> 561,2119, encontrado 561,2105.

2.2.3. Preparación de 7,9-bis(benciloxi)-3-hidroxi-1-(hidroximetil)-6H-benzo[*c*]cromen-6-ona (5).



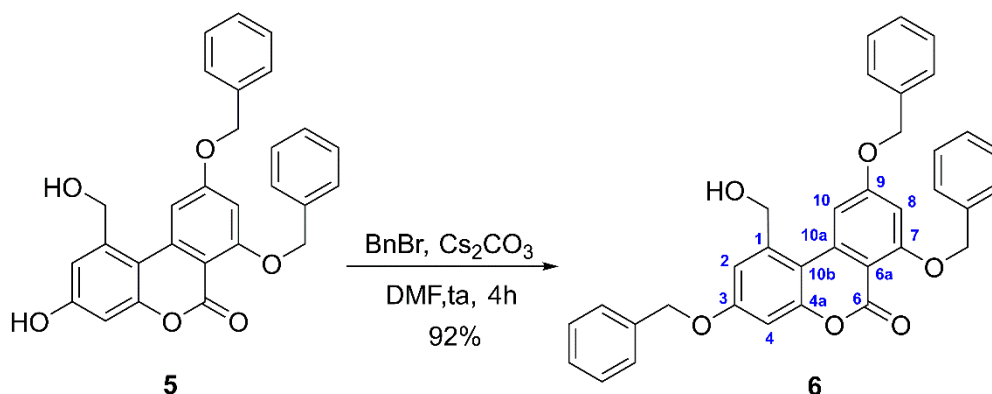
Una mezcla 50:1 de *i*PrOH y HCl concentrado (3,7 mL) se añadió a una solución del ácido carboxílico **4** (150 mg, 0,268 mmol) en THF (11 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla se agitó a 55 °C durante 27 horas, luego se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con una solución acuosa concentrada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron al vacío. El residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice, usando CHCl<sub>3</sub> como eluyente, para dar **5** (111,9 mg, 94%) como un sólido blanco amorfo. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ 9,12 (s, 1H, PhOH), 7,83 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-10), 7,70 (d ancho, *J* = 7,6 Hz, 2H, 2xCH Ph), 7,54 (d ancho, *J* = 7,5 Hz, 2H, 2xCH Ph), 7,44–7,38 (m, 4H, 4xCH Ph), 7,37 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, CH Ph), 7,31 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H, CH Ph), 7,02 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-2), 6,91 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-8), 6,68 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-4), 5,35 y 5,33 (cada una s, cada una 2H, 2xOCH<sub>2</sub>Ph), 4,91 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 4,80 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>OH); RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ 165,2 (C-6), 163,4 (C-9), 159,6 (C-3), 157,1 (C-7), 155,0 (C-4a), 141,9 (C-1), 140,5 (C-10a), 138,1 y 137,5 (2xC Ph), 129,4 (2xCH Ph), 129,2 (2xCH Ph), 129,0 (CH Ph), 128,9 (2xCH Ph), 128,3 (CH Ph), 127,7 (2xCH Ph), 116,3 (CH-2), 111,3 (C-10b), 104,8 (CH-10), 104,6 (C-6a), 103,1 (CH-4), 101,1 (CH-8), 71,2 y 71,0 (2xOCH<sub>2</sub>Ph), 64,7 (CH<sub>2</sub>OH); EMAR (TOF, ES+) *m/z* calculado para C<sub>28</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 455,1489, encontrado 455,1484.

10

15

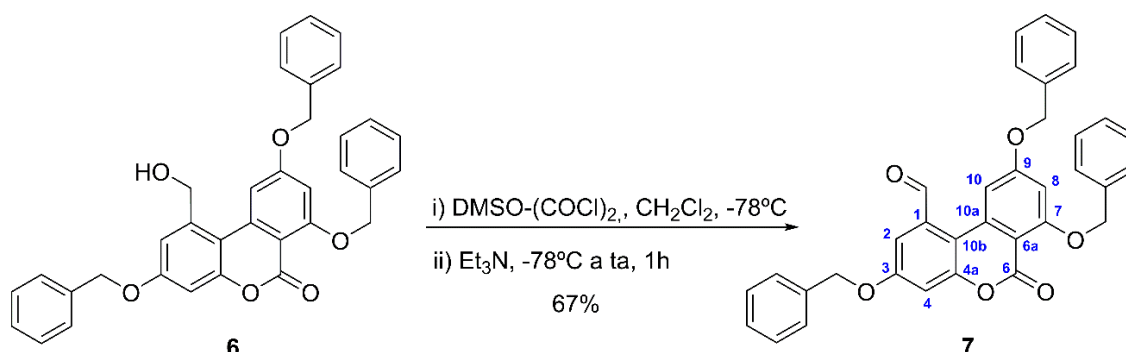
20

2.2.4. Preparación de 3,7,9-tris(benciloxi)-1-(hidroximetil)-6H-benzo[c]cromen-6-ona (6).

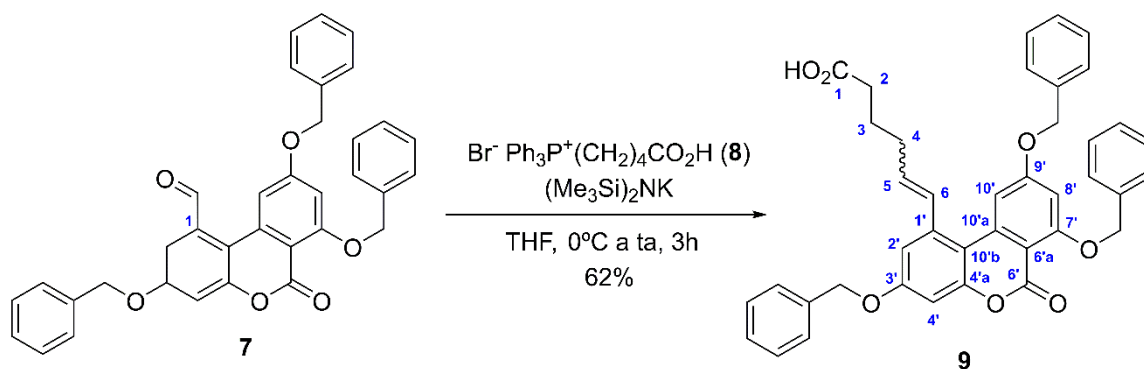


Bromuro de bencilo (45,5  $\mu\text{l}$ , 0,383 mmol, 1,5 equiv) se añadió a una suspensión del compuesto **5** (116 mg, 0,255 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (124,7 mg, 0,383 mmol, 1,5 equiv) en DMF anhidra (3 mL) bajo nitrógeno. La mezcla amarillenta resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, luego se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y una solución acuosa al 1,5% de LiCl, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentraron al vacío. El residuo resultante se cromatografió sobre gel de sílice, utilizando  $\text{CHCl}_3$  como eluyente, para proporcionar el derivado tribencilado **6** (127,3 mg, 92%) como un aceite ligeramente amarillento. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,58 (d ancho,  $J = 7,6$  Hz, 2H, 2xCH Ph), 7,54 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H, H-10), 7,47–7,27 (m, 13H, 13xCH Ph), 7,01 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H, H-2), 6,76 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1H, H-4), 6,63 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H, H-8), 5,22, 5,19 y 5,06 (cada una s, cada una 2H, 3xOCH<sub>2</sub>Ph), 4,83 (d,  $J = 5,7$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 2,15 (t,  $J = 5,7$  Hz, CH<sub>2</sub>OH); RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164,3 (C-6), 162,7 (C-9), 159,6 (C-7), 157,7 (C-3), 154,0 (C-4a), 139,4 (C-1), 139,1 (C-10a), 136,4 (C Ph), 136,2 (2xC Ph), 128,9 (4xCH Ph), 128,8 (2xCH Ph), 128,5 (CH Ph), 128,4 (CH Ph), 127,9 (CH Ph), 127,7 (2xCH Ph), 127,6 (2xCH Ph), 126,8 (2xCH Ph), 115,8 (CH-2), 111,5 (C-10b), 104,3 (C-6a), 103,6 (CH-10), 102,0 (CH-4), 100,9 (CH-8), 70,9, 70,4 y 70,3 (3xOCH<sub>2</sub>Ph), 65,1 (CH<sub>2</sub>OH); EMAR (TOF, ES+)  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{35}\text{H}_{29}\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  545,1959, encontrado 545,1945.

2.2.5. Preparación de 3,7,9-tris(benciloxi)-6-oxo-6H-benzo[c]cromeno-1-carbaldehído (7).

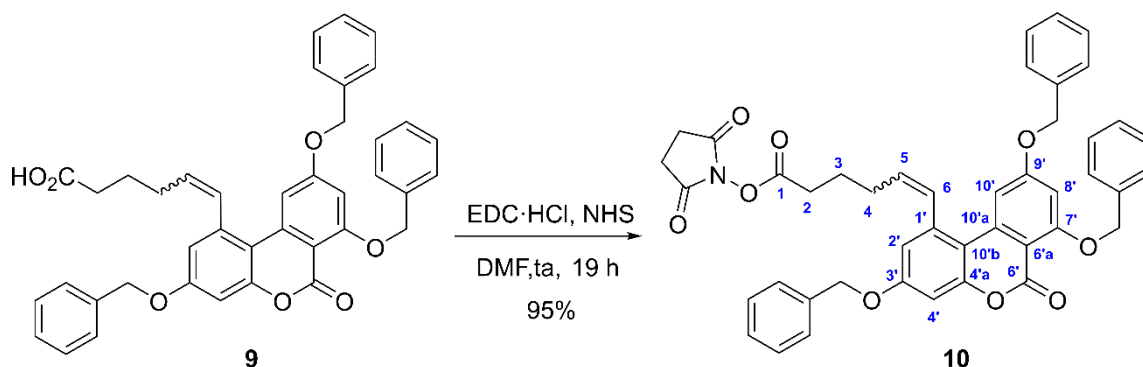


DMSO (9,9  $\mu$ L, 0,139 mmol) se añadió gota a gota a una solución de cloruro de oxalilo (5,9  $\mu$ L, 0,069 mmol, 1,5 equiv) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (140  $\mu$ L) a -78 °C bajo nitrógeno. Después de agitar durante 15 min, se añadió una solución de alcohol **6** (25 mg, 0,046 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,5 mL) y la mezcla se agitó durante 30 min más antes de añadir Et<sub>3</sub>N (38,5  $\mu$ L, 0,276 mmol, 6 equiv). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 hora y luego se dejó calentar lentamente hasta temperatura ambiente, se adicionó una disolución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se diluyó con agua y se extrajo con Et<sub>2</sub>O. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron al vacío para dar un residuo oleoso que se cromatografió sobre gel de sílice usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente para dar el aldehído **7** (16,7 mg, 67%) como un aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10,25 (s, 1H, CHO), 7,58 (d ancho,  $J$  = 7,6 Hz, 2H, 2xCH Ph), 7,46–7,31 (m, 13H, 13xCH Ph), 7,31 (d,  $J$  = 2,7 Hz, 1H, H-2), 7,06 (d,  $J$  = 2,7 Hz, 1H, H-4), 6,72 (d,  $J$  = 2,1 Hz, 1H, H-8), 6,57 (d,  $J$  = 2,1 Hz, 1H, H-10), 5,29, 5,17 y 5,14 (cada una s, cada una 2H, 3xOCH<sub>2</sub>Ph); RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  190,9 (CHO), 164,2 (C-6), 163,0 (C-9), 160,0 (C-7), 156,9 (C-3), 153,9 (C-4a), 137,1 (C-1), 136,4 (C-10a), 136,0 (C Ph), 135,7 (C Ph), 135,5 (C Ph), 129,0 (2xCH Ph), 128,9 (2xCH Ph), 128,8 (2xCH Ph), 128,7 (CH Ph), 128,6 (CH Ph), 128,1 (CH Ph), 127,7 (2xCH Ph), 127,6 (2xCH Ph), 126,8 (2xCH Ph), 113,0 (CH-2 y C-10b), 106,9 (CH-4), 105,3 (CH-10), 104,5 (C-6a), 71,1, 70,8 y 70,7 (3xOCH<sub>2</sub>Ph); EMAR (TOF, ES+)  $m/z$  calculado para C<sub>35</sub>H<sub>27</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 543,1802, encontrado 543,1798.



2.2.6. Preparación del ácido 6-(3,7,9-tris(benciloxi)-6-oxo-6H-benzo[*c*]cromen-1-il)hex-5-enoico (9). Una solución 0,5 M de bis(trimetilsilil)amida de potasio en tolueno (158  $\mu\text{L}$ , 79  $\mu\text{mol}$ , 2,6 equiv) se añadió gota a gota a una disolución de bromuro de (4-carboxibutil)trifenilfosfonio (17,5 mg, 39,5  $\mu\text{mol}$ , 1,3 equiv) en THF anhidro (0,5 mL) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos a esta temperatura antes de añadir gota a gota una solución del aldehído 7 (16,5 mg, 30,4  $\mu\text{mol}$ ) en THF (0,5 mL). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. Pasado este tiempo se añadió agua, se enfrió a 0 °C, se acidificó con  $\text{KHSO}_4$  acuoso 1 M y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentraron a vacío. La purificación cromatográfica del residuo obtenido, utilizando  $\text{CHCl}_3$  como eluyente, proporcionó el alqueno 9 (11,8 mg, 62%) como un semisólido, aproximadamente una mezcla 9:1 de isómeros *cis* y *trans* del doble enlace formado. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), solo se dan las señales del isómero mayoritario,  $\delta$  7,71 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H, H-10'), 7,58 (d ancho,  $J = 7,3$  Hz, 2H, 2xCH Ph), 7,46–7,27 (m, 13H, 13xCH Ph), 6,82 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H, H-4'), 6,66 (d ancho,  $J = 11,3$  Hz, 1H, H-6), 6,63 (dos d superpuestos,  $J = 2,7, 2,1$  Hz, cada uno 1H, H-2' y H-8'), 5,71 (dt,  $J = 11,3, 7,4$  Hz, 1H, H-5), 5,26 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,10 (s, 4H, 2x $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 2,28 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ -2), 2,15 (dtd,  $J = 7,5, 7,5, 1,5$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ -4), 1,68 (p,  $J = 7,6$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ -3); RMN  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178,0 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 163,8 (C-6'), 162,7 (C-9'), 159,2 (C-7'), 157,7 (C-3'), 154,1 (C-4'a), 140,3 (C-1'), 136,9 (C-10'a), 136,4 (C Ph), 136,3 (C Ph), 136,0 (C Ph), 131,9 (CH-6), 131,7 (CH-5), 128,9 (2x CH Ph), 128,9 (2x CH Ph), 128,8 (2x CH Ph), 128,5 (CH Ph), 128,4 (CH Ph), 127,9 (CH Ph), 127,6 (2x CH Ph), 127,4 (2xCH Ph), 126,8 (2xCH Ph), 115,6 (CH-2'), 110,4 (C-10'b), 104,2 (C-6'a), 103,4 (CH-10'), 101,5 (CH-4'), 100,7 (CH-8'), 70,9 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 70,4 (2x $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 33,4 ( $\text{CH}_2$ -2), 27,9 ( $\text{CH}_2$ -4), 24,5 ( $\text{CH}_2$ -3); EMAR (TOF, ES+)  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{40}\text{H}_{35}\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  627,2377, encontrado 627,2366.

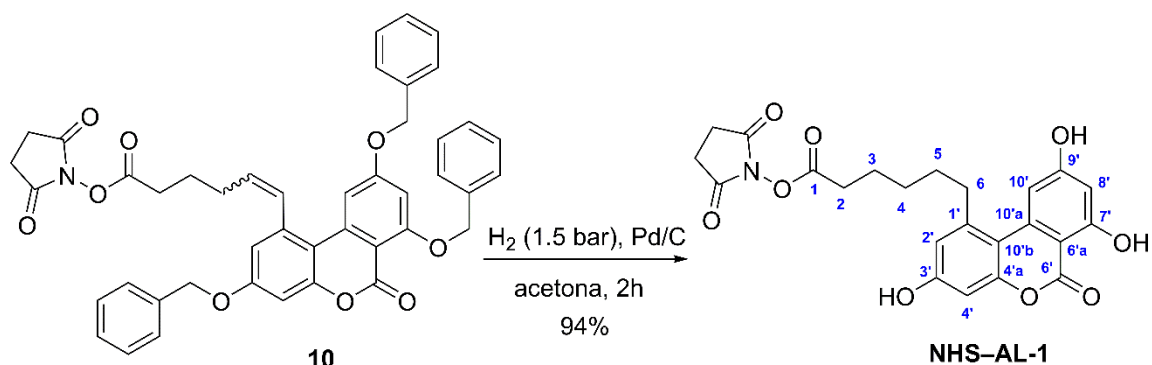
2.2.7. Preparación de 6-(3,7,9-tris(benciloxi)-6-oxo-6H-benzo[c]cromen-1-il)hex-5-enoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**10**).



Una solución del ácido **9** (11,0 mg, 17,6  $\mu\text{mol}$ ), clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (5,1 mg, 26,6  $\mu\text{mol}$ , 1,5 equiv) y *N*-hidroxisuccinimida (3,1 mg, 26,9  $\mu\text{mol}$ , 1,5 equiv) en DMF anhidra (0,6 mL) se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se diluyó con AcOEt y se lavó sucesivamente con agua, una solución acuosa al 1,5% de LiCl y salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentró a presión reducida para dar el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **10** (12 mg, 95%) como un aceite incoloro. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,69 (d,  $J = 2,2$  Hz, H-10'), 7,59 (d ancho,  $J = 7,2$  Hz, 2H, 2xCH Ph), 7,45–7,29 (m, 13H, 13xCH Ph), 6,84 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H, H-4'), 6,71 (d,  $J = 11,3$  Hz, 1H, H-6), 6,63 (dos d superpuestos,  $J = 2,7, 2,2$  Hz, cada una 1H, H-2' y H-8'), 5,70 (dt,  $J = 11,3, 7,3$  Hz, 1H, H-5), 5,27 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,12 (s, 4H, 2x $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 2,74 (s, 4H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,52 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ -2), 2,20 (dtd,  $J = 7,5, 7,5, 1,6$  Hz,  $\text{H}_2$ -4), 1,78 (p,  $J = 7,5$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ -3); RMN  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169,1 (2xCONO), 168,4 (C-1) 163,8 (C-6'), 162,7 (C-9'), 159,2 (C-7'), 157,7 (C-3'), 154,1 (C-4'a), 140,3 (C-1'), 136,8 (C-10'a), 136,4 (C Ph), 136,3 (C Ph), 136,1 (C Ph), 132,2 (CH-6), 131,2 (CH-5), 128,9 (2xCH Ph), 128,8 (2xCH Ph), 128,7 (2xCH Ph), 128,5 (CH Ph), 128,4 (CH Ph), 127,9 (CH Ph), 127,6 (2xCH Ph), 127,3 (2xCH Ph), 126,8 (2xCH Ph), 115,4 (CH-2'), 110,4 (C-10'b), 104,3 (C-6'a), 103,3 (CH-10'), 101,7 (CH-4'), 100,8 (CH-8'), 70,9, 70,3 y 70,4 (3x $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 30,7 ( $\text{CH}_2$ -2), 27,7 ( $\text{CH}_2$ -4), 25,7 ( $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 24,5 ( $\text{CH}_2$ -3). EMAR (TOF, ES+)  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{NO}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  724,2541, encontrado 724,2556.

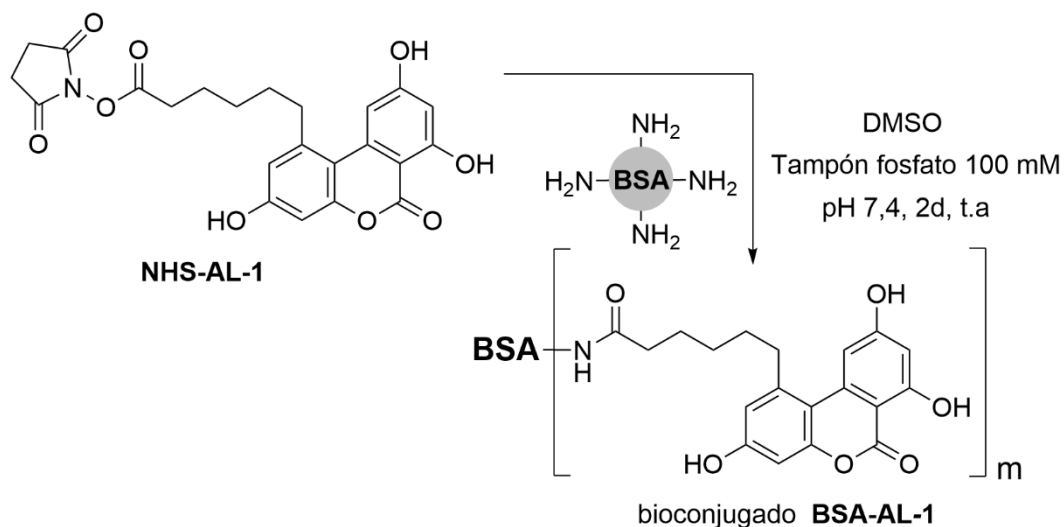


2.2.8. Preparación de 6-(3,7,9-trihidroxi-6-oxo-6H-benzo[c]cromen-1-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**NHS-AL-1**).



Una suspensión del derivado tribencilado **10** (10 mg, 13,8  $\mu\text{mol}$ ) y 5% Pd sobre carbono (5 mg, 2,3  $\mu\text{mol}$ ) en acetona (3 mL) y la mezcla se desgasificó mediante tres ciclos vacío/hidrógeno. La presión de hidrógeno se ajustó a 1,5 atm y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  usando THF para lavar. El filtrado y el THF del lavado se concentraron a presión reducida para proporcionar el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno AL-1, (**NHS-AL-1**, 5,9 mg, 94%) como un aceite incoloro. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, THF- $d_8$ )  $\delta$  11,97, 9,63 y 9,12 (cada una s, cada una 1H, 3xOH), 7,09 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H, H-10'), 6,70 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H, H-2'), 6,59 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H, H-4'), 6,34 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H, H-8'), 3,12 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H, H2-6), 2,75 (s ancho, 4H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2,64 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H, H2-2), 1,83–1,76 (m, 4H, H2-3 y H2-5), 1,62 (m, 2H, H2-4).

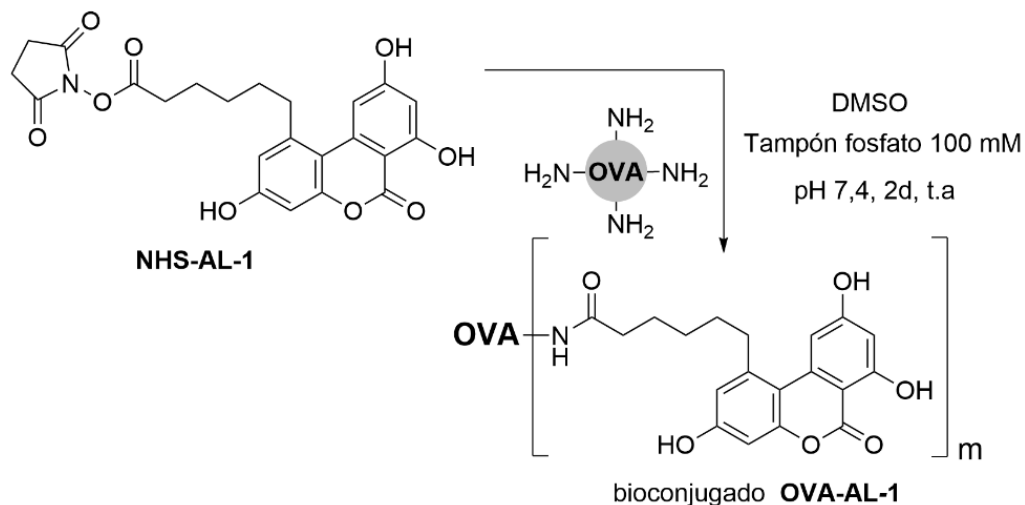
### 2.3. Preparación de un conjugado del hapteno AL-1 con BSA (BSA-AL-1).



88  $\mu\text{L}$  de la disolución del éster activo NHS-AL-1 (50 mM en DMSO) obtenido en la reacción anterior se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 1 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón fosfato 100 mM, pH 7,4. La reacción de conjugación se incubó durante 2 días 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 que contenían el conjugado de BSA se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL con tampón de elución y se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

Para determinar el grado de conjugación ( $m$ ) obtenido en el conjugado, una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del conjugado BSA-AL-1 purificado se dializó (diálisis contra 5 L de agua desionizada durante 24 h a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , con al menos 4 cambios de agua); finalmente, el producto dializado se liofilizó y el número de moléculas de hapteno (AL-1) conjugadas por molécula de BSA se determinó mediante MALDI-TOF-MS ( $m = 12,7$ , ver Tabla 1, entrada 1).

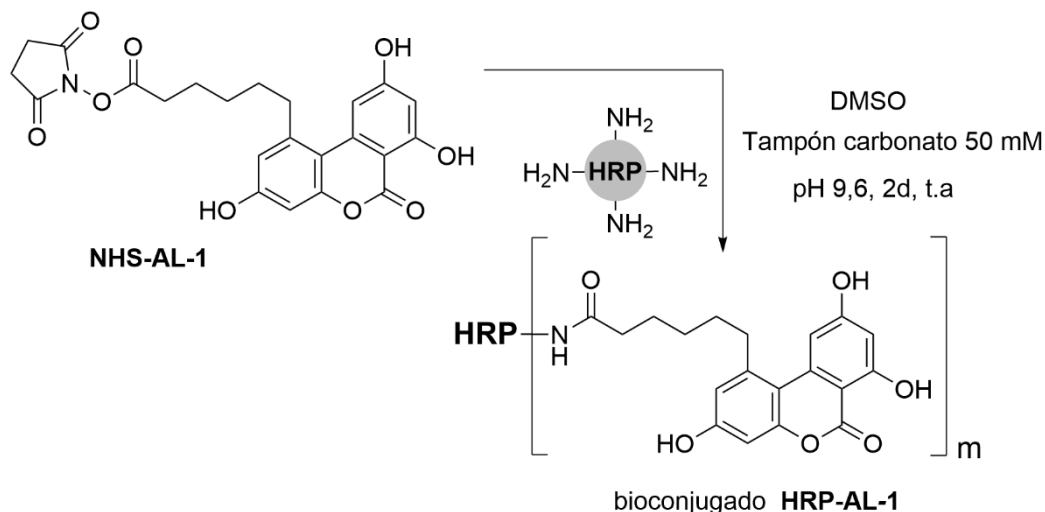
#### 2.4. Preparación de un conjugado del hapteno AL-1 con OVA (OVA-AL-1).



A partir de una disolución 50 mM del hapteno activado NHS-AL-1 en DMSO, se tomaron 122  $\mu\text{L}$  y se añadieron lentamente y con agitación constante a un volumen de 1,8 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón fosfato 100 mM, pH 7,4. Después de 2 días de reacción en agitación suave y a temperatura ambiente, se procedió a la purificación del conjugado 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-AL-1 recién obtenido se dializó y liofilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número de moléculas de hapteno (AL-1) acoplados a la proteína mediante MALDI-TOF-MS ( $m = 3,9$ , ver Tabla 1, entrada 2).

### 3. Preparación de conjugados de fórmula (III)

**Ejemplo 2:** Preparación de conjugados de fórmula (III) para  $\text{T} = \text{R-I}$ ,  $\text{L} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{Z} = -(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$  y  $\text{Q} = \text{HRP}$  (peroxidasa de rábano picante).



**3.1. Preparación de un conjugado del hapteno AL-1 con HRP (HRP-AL-1).** A partir de una disolución 5 mM del hapteno activado NHS-AL-1, preparado como se ha descrito en el apartado 2.2, en DMSO, se tomaron 183  $\mu$ L y se añadieron lentamente y con agitación constante y suave sobre 0,9 mL de una disolución de HRP a una concentración de 3 mg/mL en tampón carbonato 50 mM, pH 7,4. La reacción de conjugación se incubó durante 2 días a temperatura ambiente. Posteriormente, el conjugado se purificó siguiendo el procedimiento descrito previamente para los conjugados de BSA y OVA, y se llevó a una concentración de 400  $\mu$ g/mL en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenó a 4 °C. Una alícuota del conjugado HRP-AL-1 recién obtenido se dializó y liofilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número de moléculas de hapteno (AL-1) acoplados a la proteína mediante MALDI-TOF-MS ( $m = 1,8$ , ver Tabla 1, entrada 3).

**TABLA 1.** Valores de la carga hapténica de los conjugados proteicos del hapteno AL-1 determinados por MALDI-TOF-MS.

	Conjugado	$RM_0$	$m/z$		$\Delta(m/z)$	$\Delta m/hapteno$	$m$
			proteína (P)/enzima de referencia	$m/z$			
1	BSA-AL-1	40	66.871	71.176	4.305	340	12,7
2	OVA-AL-1	10	26.109 <sup>#</sup>	26.777 <sup>#</sup>	668	340	3,9
3	HRP-AL-1	15	43.598	44.226	628	340	1,8

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

$m$ : relación molar hapteno/proteína o enzima obtenida para cada conjugado

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

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

<sup>#</sup>  $m/z$  correspondiente al ion doblemente cargado ( $[M+2H]^{2+}$ )

#### 4. Procedimiento ELISA

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada anticuerpo se evaluó mediante ELISA competitivo en el formato de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta usando antígenos de ensayo homólogos, es decir, un antígeno de ensayo preparado a partir del mismo conjugado de fórmula (IIa) en el que **P** es ovoalbúmina (OVA).

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.).

Las placas se tapizaron con 100  $\mu$ L por pocillo de una disolución de antígeno de ensayo que es un conjugado de fórmula (IIa), donde P es OVA, a diversas concentraciones 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 dispuso 50  $\mu$ L por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50  $\mu$ L por pocillo de un determinado anticuerpo diluido en PBST (0,05% Tween 20). La reacción inmunológica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. A continuación, cada pocillo recibió 100  $\mu$ L de una dilución 1/10000 de GAR-HRP (anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo marcado con peroxidasa), para los ensayos con antisueros, o de una dilución 1/2000 de RAM-HRP (anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con peroxidasa), para

los ensayos con anticuerpos monoclonales, ambas en PBST. Esta reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar las placas, la actividad peroxidasa retenida se reveló con 100  $\mu$ L por pocillo de una disolución comercial de TMB. Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100  $\mu$ L por pocillo de ácido sulfúrico 1 M. Al finalizar los ensayos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 450 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 representar la absorbancia frente al logaritmo de la concentración de analito se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando el paquete informático SigmaPlot de SPSS (Chicago, EE.UU.).

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

#### **5. Producción de anticuerpos policlonales. Inmunización de conejos**

Se inmunizaron, siguiendo protocolos estandarizados, 2 hembras de conejo de la raza New Zealand con cada conjugado de fórmula (II), donde **P** es BSA (conjugados inmunizantes). Cada animal recibió 0,3 mg de uno de los conjugados de fórmula (IIa) disuelto en 1 mL de una mezcla 1:1 de tampón PB y adyuvante de Freund completo. La inmunización prosiguió con la inoculación de una dosis de recuerdo cada 21 días con la misma cantidad de conjugado, pero empleando adyuvante de Freund incompleto. Diez días después de la cuarta inyección, los animales fueron desangrados y la sangre obtenida se dejó coagular a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperaron los sueros por centrifugación, se diluyeron a  $\frac{1}{2}$  con PBS frío y se les añadió un volumen de una disolución saturada de sulfato amónico. El precipitado proteico resultante de cada suero se recogió por centrifugación y se redisolvió en tampón PBS frío. Finalmente, las proteínas se reprecipitaron como anteriormente y se almacenaron en este estado a 4 °C. Este precipitado contiene una mezcla indeterminada de proteínas que denominamos antisuero, anticuerpo policlonal o simplemente anticuerpo. Se obtuvieron dos anticuerpos a partir del conjugado de fórmula (IIa), donde **P** es BSA, identificados como #1 y #2.

## 6. Producción de anticuerpos monoclonales de ratón

### 6.1. Inmunización de ratones

Para la inmunización se empleó el conjugado de fórmula (IIa), donde **P** es BSA (conjugado inmunizante), obtenido según se describe en los ejemplos anteriores. Se  
5 utilizaron hembras de ratón BALB/c, con una edad al inicio del proceso comprendida entre 6 y 8 semanas.

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

### 6.2. Fusiones celulares para la obtención de hibridomas

15 Las fusiones con los ratones inmunizados se llevaron a cabo básicamente siguiendo metodologías previamente descritas y bien establecidas en el estado de la técnica. 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  
20 lavaron 2 veces con medio completo (con suero) frío y se filtraron para eliminar los coágulos formados.

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  
25 fase de crecimiento exponencial, de manera que el día de la fusión se dispusiera de un número suficiente de las mismas.

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  
30 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  $150 \times 10^3$  linfocitos por pocillo, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> 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).

### 6.3. 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 alternariol 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 en formato indirecto, 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 conjugado de fórmula (IIa) 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 4.

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 alternariol e inhibición de la señal igual o superior al 80% en el ensayo en presencia de alternariol. Adicionalmente, para todos los pocillos positivos se llevó a cabo un segundo cribado 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 conjugado homólogo a 0,01 y 0,1 µg/mL, y utilizando como competidor alternariol a 10 y 100 nM (en ensayo). Así, 200 µL del



sobrenadante de cultivo se diluyeron en 600  $\mu\text{L}$  de PBST y las siguientes diluciones se hicieron de forma seriada a partir de esta primera. El ensayo se realizó añadiendo 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de la correspondiente dilución de sobrenadante y 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de alternariol en PBS a la concentración de 100, 10 y 0 nM.

- 5 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 2 células por pocillo en medio HT, de igual composición que el HAT pero sin aminopterina, y conteniendo HFCS al 1% (v/v).

- 10 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 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
- 15 progresivamente el hibridoma en recipientes de mayor 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  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  en el interior de una caja de poliestireno durante 24 h antes de pasarlos al contenedor de nitrógeno líquido.

#### 20 **6.4. 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 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
- 25 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  $4\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su 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
- 30 anticuerpo precipitado se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm ( $4000\times g$ ) 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  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{g/mL}$  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.

## 10 7. Resultados

### 7.1. Respuesta inmunitaria y determinación de la afinidad de los antisueros

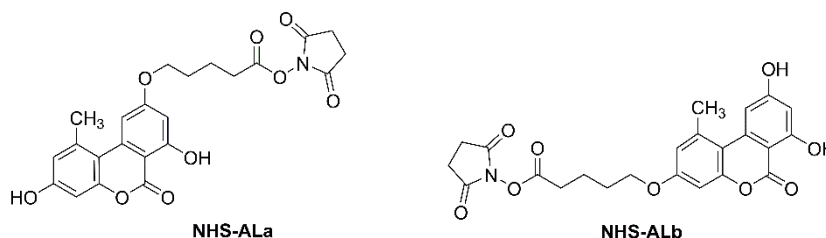
Cada uno de los antisueros obtenidos se ensayó frente al antígeno de ensayo homólogo usando el ensayo de tipo ELISA competitivo en el formato de conjugado inmovilizado. Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno de ensayo frente a diferentes concentraciones de anticuerpo utilizando como competidor varias concentraciones de alternariol o alternariol monometil éter preparadas por dilución seriada. Los antisueros procedentes del inmunógeno basado en el conjugado de fórmula (IIa) donde **P** es BSA presentaron títulos elevados. Además, los antisueros procedentes de animales inmunizados con este inmunógeno presentaron una elevada afinidad hacia alternariol, con valores de  $\text{IC}_{50}$  inferiores a 2,5 nM. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de una curva de inhibición de alternariol con el antisuero IIa#2. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  y de reactividad cruzada para alternariol y alternariol monometil éter de cada antisuero utilizando antígenos de ensayo homólogos de estructura (IIa) donde **P** es OVA se han incluido en la Tabla 2. A efectos comparativos, en la misma tabla se recogen las afinidades hacia alternariol y alternariol monometil éter de antisueros obtenidos de forma análoga a partir de inmunógenos previamente conocidos en los que la proteína se encuentra unida al esqueleto de alternariol por posiciones diferentes que en el conjugado de fórmula (IIa), en particular, a través de las posiciones hidroxiladas en C-3 y C-9 (L. G. Addante-Moya et al., *Toxins* **2021**, 13, 883). Estos resultados muestran que estos conjugados antigénicos comparativos proporcionan anticuerpos, tanto en términos de afinidad como de especificidad hacia alternariol, claramente inferiores (mayor  $\text{IC}_{50}$ ) que los producidos por los conjugados descritos en esta invención.

Por otro lado, los antisueros obtenidos con el inmunógeno de fórmula (IIa) donde **P** es BSA fueron específicos de alternariol, mientras que los obtenidos con los inmunógenos comparativos reconocieron mejor alternariol monometil éter, con una reactividad cruzada muy superior. La reactividad cruzada es el cociente entre el valor de IC<sub>50</sub> para alternariol y el valor de IC<sub>50</sub> para alternariol monometil éter, expresado en porcentaje. Estos resultados confirman que los conjugados inmunogénicos en los que el esqueleto de alternariol se une a la proteína portadora a través del grupo metilo en C-1, y que por tanto deja libres todos los grupos hidroxilo, dan lugar a anticuerpos de mayor afinidad y sobre todo de mayor especificidad hacia alternariol.

**TABLA 2.** Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo con antígeno de ensayo homólogo (n = 3).<sup>a</sup>

Antisuero <sup>b</sup>	[OVA] (µg/mL)	Dilución Antisuero (x10 <sup>3</sup> )	IC <sub>50</sub> Alternariol (nM)	IC <sub>50</sub> Alternariol monometil éter (nM)	Reactividad cruzada (%) <sup>c</sup>
<b>IIa#1<sup>d</sup></b>	0,1	300	2,1	>1000	< 0,2
<b>IIa#2<sup>d</sup></b>	0,1	300	1,4	>1000	< 0,1
<b>ALa#1<sup>e</sup></b>	0,1	100	6,3	3,1	204
<b>ALa#2<sup>e</sup></b>	0,01	10	36,2	8,2	442
<b>ALb#1<sup>f</sup></b>	0,1	100	6,2	402	1,6
<b>ALb#2<sup>f</sup></b>	0,1	300	27,5	403	6,8

<sup>a</sup> Los valores de A<sub>max</sub> fueron superiores a 1,0; <sup>b</sup> Antisueros de conejo; <sup>c</sup> [(IC<sub>50</sub> alternariol)/(IC<sub>50</sub> alternariol monometil éter)]x100; <sup>d</sup> Antisueros obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado BSA-AL-1 [conjugado de fórmula (IIa) donde **P** = BSA]; <sup>e</sup> Antisueros comparativos obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado de BSA con el éster activo NHS-ALa (L. G. Addante-Moya *et al.*, *Toxins* **2021**, *13*, 883); <sup>f</sup> Antisueros comparativos obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado de BSA con el éster activo NHS-ALb (L. G. Addante-Moya *et al.*, *Toxins* **2021**, *13*, 883).



## 7.2. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a alternariol

Para demostrar de manera más concluyente la idoneidad del conjugado de fórmula (IIa) para la obtención de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia alternariol, se inmunizaron ratones con el conjugado de fórmula (IIa) en el que **P** es BSA, y se llevaron a cabo fusiones celulares encaminadas a la generación de hibridomas. Se consiguió obtener 5 líneas celulares (hibridomas) productoras de anticuerpos monoclonales con elevada afinidad y especificidad hacia alternariol a partir del conjugado de fórmula (IIa). 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 **IIa**#12, mAb **IIa**#18, mAb **IIa**#21, mAb **IIa**#120 y mAb **IIa**#121 (anticuerpos monoclonales obtenidos a partir del conjugado de fórmula **IIa**).

### 7.2.1. Determinación de la afinidad de los anticuerpos

Una vez purificados por cromatografía de inmunoafinidad los 5 anticuerpos monoclonales obtenidos, se determinó su afinidad hacia alternariol mediante ELISA competitivo indirecto con antígeno de ensayo homólogo, es decir, el conjugado de fórmula (IIa) donde **P** es OVA. Cada anticuerpo monoclonal se ensayó a varias concentraciones (100, 300 y 1000 ng/mL) frente a diferentes concentraciones de antígeno de ensayo (300, 100, 30 y 10 ng/mL). Los valores de  $IC_{50}$  para alternariol y alternariol monometil éter de cada anticuerpo monoclonal se muestran en la Tabla 3 y corresponden a la combinación óptima, es decir, a la concentración de inmunorreactivos que generó la curva de calibración con un menor valor de  $IC_{50}$  para alternariol, y por tanto una afinidad mayor. En dicho formato de ensayo los anticuerpos mostraron valores de  $IC_{50}$  para alternariol en torno a 0,4 nM, siendo el anticuerpo con mayor afinidad de entre los producidos a partir del conjugado de fórmula (IIa) el mAb **IIa**#121 ( $IC_{50}=0,36$  nM). Estos anticuerpos demostraron ser totalmente específicos de alternariol ya que no reconocieron a alternariol monometil éter.

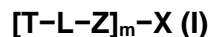
**TABLA 3.** Resultados de los ensayos en formato ELISA competitivo homólogo de antígeno inmovilizado con detección indirecta.

Anticuerpo monoclonal	[OVA] ( $\mu\text{g/mL}$ )	mAb ( $\text{ng/mL}$ )	IC <sub>50</sub> alternariol (nM)
<b>Ila#12</b>	1	100	0,38
<b>Ila#18</b>	1	30	0,39
<b>Ila#21</b>	0,1	30	0,45
<b>Ila#120</b>	0,1	100	0,45
<b>Ila#121</b>	0,1	30	0,36

Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto que los conjugados de fórmula (**Ila**) objeto de esta invención son adecuados para obtener anticuerpos monoclonales de muy elevada afinidad y especificidad frente a alternariol y por lo tanto adecuados para su implementación en diferentes plataformas inmunoanalíticas que permitan la determinación o cuantificación de alternariol a los niveles de sensibilidad más exigentes.

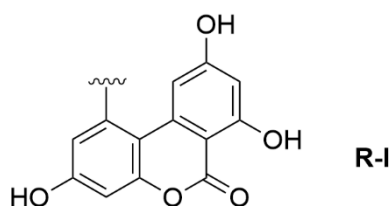
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



donde

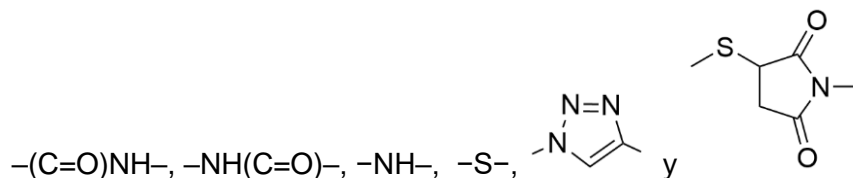
5 **T** es **R-I**,



donde **L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 12 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende la sustitución de entre 0 y 6 átomos de carbono por heteroátomos, que se seleccionan del

10 grupo que consiste en S, O y N;

**Z** es un grupo funcional seleccionado entre:



**m** es un número con un valor entre 1 y 100;

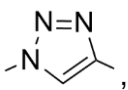
15 **X** está seleccionado entre **P** y **Q**, tal que

**P** es un péptido o polipéptido de naturaleza no enzimática, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 Dalton y

**Q** es un marcador no isotópico detectable.

20 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 6 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en S y O.

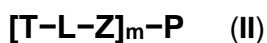
3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que, **Z** se selecciona del grupo

formado por  $-(C=O)NH-$ , y , más preferentemente, **Z** es  $-(C=O)NH-$ .

4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido o polipéptido **P** está unido a un soporte.

5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que **m** tiene un valor entre 1 y 20.

6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un conjugado de un análogo de alternariol de fórmula general (II),

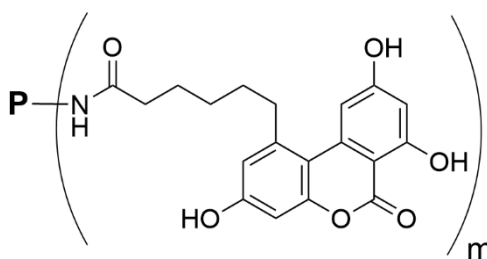


10 donde

**T**, **L**, **Z**, **P** y **m** tienen los mismos significados dados anteriormente en una de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Un compuesto según la reivindicación 6, en el que **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina, preferiblemente, **P** es albúmina, más preferiblemente albúmina de huevo o albúmina sérica.

8. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 6 ó 7, que es un conjugado de fórmula (IIa)



(IIa)

20 donde **P** y **m** son como se han definido en la reivindicación 6 ó 7.

9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, que es un derivado marcado de fórmula (III)





15. Uso de un compuesto según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la obtención de un anticuerpo.
16. Método de análisis *in vitro* de alternariol en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
- 5 17. Método según la reivindicación 16 que comprende las siguientes etapas:
- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14;
  - 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
  - 10 c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).
18. Método de análisis *in vitro* de alternariol en una muestra que comprende el uso de un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 15 19. Método según la reivindicación 18 que comprende las siguientes etapas:
- a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-alternariol y con el compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 11;
  - b) incubar la muestra, el anticuerpo y el compuesto de la etapa (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica;
  - 20 y
  - c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).
20. Método según la reivindicación 19, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando como
- 25 competidor un compuesto según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
21. Método según la reivindicación 19, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando como
- 30 competidor un derivado marcado según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

22. Kit de detección y/o determinación de alternariol, que comprende al menos un anticuerpo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 junto con un compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

5 23. Método de purificación y/o concentración de alternariol de una muestra que comprende el uso de un anticuerpo según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.

24. Método según la reivindicación 21 realizado mediante cromatografía de afinidad que comprende las siguientes etapas:

- 10
- a) inmovilizar al menos un anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 sobre un soporte;
  - b) hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que retenga alternariol presente en dicha muestra; y
  - c) eluir el alternariol retenido en el soporte.

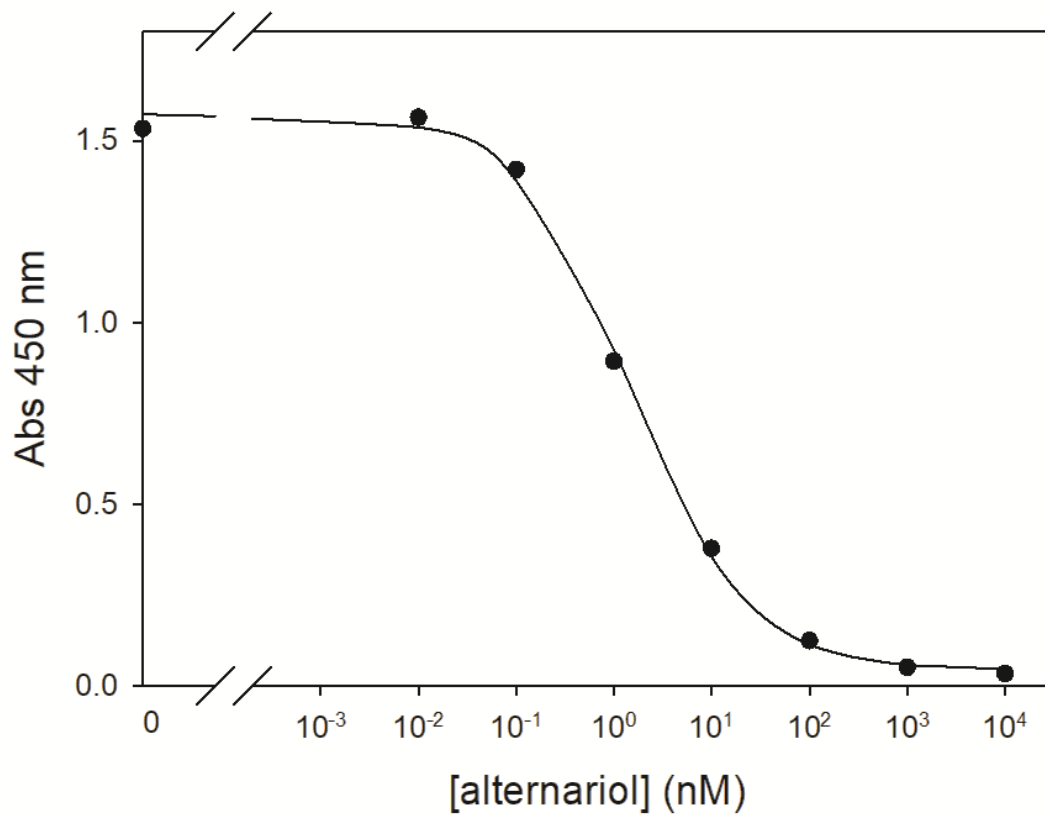


Fig. 1



- ②① N.º solicitud: 202230811  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.09.2022  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ADDANTE-MOYA LUIS G et al. "Assessment of the Optimum Linker Tethering Site of Alternariol Haptens for Antibody Generation and Immunoassay Development". Toxins DEC 2021, 30/11/2021, Vol. 13, Páginas 1-16. Article No.: 883, ISSN 2072-6651(electronic), <DOI: 10.3390/toxins13120883>. Ver resumen; apartado 2; esquema 2; tabla 1.	1-24
A	CN 105712970 A (UNIV SOUTH CHINA AGRICULT) 29/06/2016, Resumen World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido) Thomson Publications, LTD. [Recuperado el 10/07/2023] DW 201667, N.º de acceso 2016-443853; Descripción.	1-24
A	ACKERMANN YVONNE et al. "Widespread Occurrence of Low Levels of Alternariol in Apple and Tomato Products, as Determined by Comparative Immunochemical Assessment using Monoclonal and Polyclonal Antibodies". Journal of Agricultural and Food Chemistry JUN 22 2011, 31/05/2011, Vol. 59, Páginas 6360-6368, ISSN 0021-8561, <DOI: 10.1021/jf201516f>. Ver Resumen y apartado Materiales y Métodos.	1-24

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  
31.07.2023

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D311/80** (2006.01)

**C07K1/113** (2006.01)

**C07K14/77** (2006.01)

**C07K14/765** (2006.01)

**G01N33/53** (2006.01)

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

C07D, C07K, G01N

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, NPL, XPESP, CAS