

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 287**

21 Número de solicitud: 202330076

51 Int. Cl.:

C07D 313/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C07K 16/14 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.02.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.09.2024

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

C/ Serrano 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.0%)

72 Inventor/es:

MERCADER BADIA, Josep Vicent;

ABAD FUENTES, Antonio;

ABAD SOMOVILLA, Antonio y

AGULLÓ BLANES, Consuelo

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

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

57 Resumen:

Compuestos y anticuerpos para la inmunodetección de zearalenona.

La presente invención se refiere a compuestos, especialmente a conjugados y derivados marcados de zearalenona por una posición novedosa de la molécula, adecuados para la producción de anticuerpos de elevada afinidad para zearalenona. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de dichos conjugados de zearalenona y de derivados marcados de zearalenona como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere al uso de los compuestos para el análisis, concentración y extracción de zearalenona 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 zearalenona que comprende anticuerpos frente a esta micotoxina, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados de zearalenona.

ES 2 978 287 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE ZEARALENONA

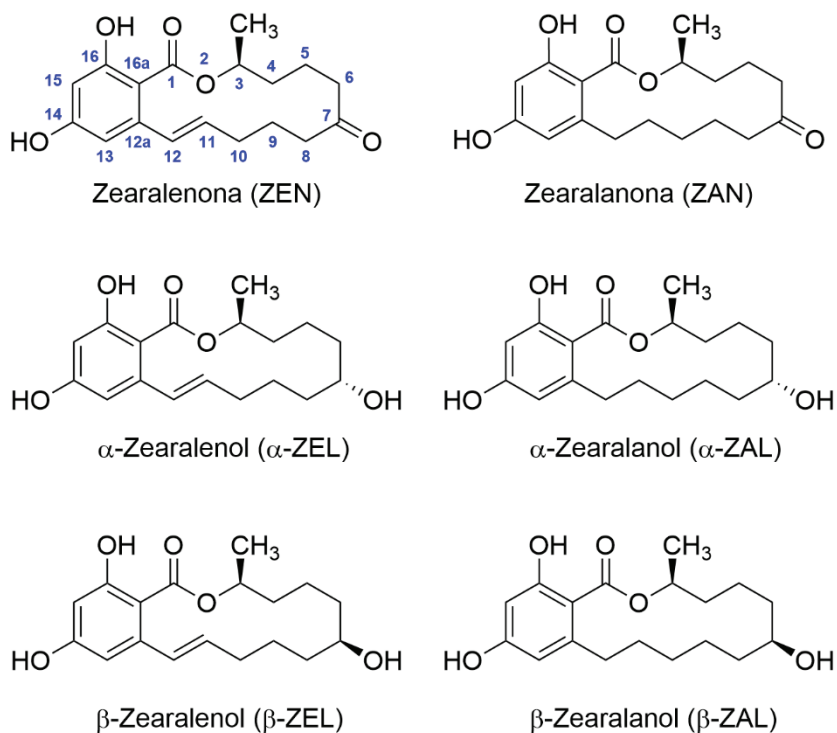
CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos, especialmente a conjugados y derivados
marcados de zearalenona por una posición novedosa de la molécula, adecuados para
la producción de anticuerpos de elevada afinidad para zearalenona. Asimismo, la
presente invención también se refiere al uso de conjugados de zearalenona y de
derivados marcados de zearalenona como antígenos de ensayo. Además, la presente
10 invención también se refiere al uso de los compuestos para el análisis, concentración
y extracción de zearalenona 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 zearalenona que comprende anticuerpos frente
a esta micotoxina, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados
15 o derivados marcados de zearalenona.

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,
20 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, llamadas micotoxinas. Particularmente,
zearalenona es uno de los metabolitos secundarios tóxicos más importantes producidos
por hongos del género *Fusarium*. Estructuralmente, zearalenona es una lactona
25 macrocíclica del ácido β -resorcíclico. Debido a su similitud estructural con los
estrógenos naturales, se describe como un compuesto estrogénico que induce efectos
negativos evidentes en humanos y animales. Zearalenona es una de las micotoxinas
más frecuentes en todo el mundo y se encuentra con frecuencia en el maíz, el trigo, la
cebada y otros cereales, y ocasionalmente en la leche. El Panel de Contaminantes para
30 la Cadena Alimentaria de la EFSA estimó una ingesta diaria tolerable (IDT) de 0,25 $\mu\text{g/kg}$
de peso corporal por día. Las estimaciones de exposición a esta toxina, basadas en
datos analíticos de presencia en varias categorías de alimentos y datos de consumo de

alimentos, sugieren que la exposición humana a zearalenona y sus formas modificadas puede estar cerca o incluso superar el valor de IDT para algunos grupos de consumidores. Las cantidades máximas permitidas de esta micotoxina en la Unión Europea se han establecido en valores que oscilan para granos de cereales entre 75 y 400 µg/kg, según el producto y el uso previsto. Se ha establecido un límite más restrictivo de 20 µg/kg para los alimentos elaborados a base de cereales destinados al consumo de lactantes y niños pequeños (Munkvold, *Methods Mol. Biol.* **2017**, 1542, 51–106; <https://cutt.ly/0Cc4ktx>). Actualmente, se han identificado varios metabolitos de zearalenona (ZEN), principalmente zearalanona (ZAN), α-zearalenol (α-ZEL), β-zearalenol (β-ZEL), α-zearalanol (α-ZAL) y β-zearalanol (β-ZAL), aunque no están incluidos en la legislación de la UE. Particularmente, α-ZAL se utiliza como promotor de crecimiento en algunos países bajo el nombre de zeranol; sin embargo, este compuesto está prohibido en la UE, por lo que se incluye en muchos programas oficiales de control.



Las técnicas analíticas para la determinación de zearalenona 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 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 zearalenona, 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 en un animal de experimentación. Para poder generar anticuerpos para zearalenona 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 la incorporación, en la posición óptima 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.

En el caso de zearalenona, los enfoques publicados hasta ahora para la síntesis de haptenos han implicado principalmente el uso de un derivado simple de zearalenona-oxima y, solo en algunos ejemplos, se empleó una supuesta funcionalización a través del grupo hidroxilo en la posición C-16 (Dong et al., *Food Chem.* **2018**, *247*, 8–15; Teahima et al., *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1618–1622; Burkin et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **2002**, *38*, 263–268; Gao et al., *Analyst* **2012**, *137*, 229–236). Estas estrategias de funcionalización implican cambios relevantes en las propiedades estereoelectrónicas y en la conformación de la molécula original, lo que da como resultado, en su mayoría, anticuerpos de elevada afinidad, pero con especificidad moderada hacia zearalenona.

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 con la selectividad deseada, sino también para su implementación en nuevas 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 zearalenona, preferentemente mediante la utilización de un kit que pueda ser
5 utilizado por la industria alimentaria, agrícola, clínica y/o medioambiental. Asimismo, los conjugados basados en haptenos funcionalizados a través de una posición de la molécula de zearalenona nunca antes explorada pueden, en combinación con anticuerpos pre-existentes o generados a partir de aproximaciones convencionales,
10 posibilitar el desarrollo de métodos inmunoanalíticos para la determinación de zearalenona con prestaciones superiores a los actualmente disponibles.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención aporta una solución a la limitada sensibilidad y selectividad de los actuales métodos inmunoanalíticos para la determinación de zearalenona al
15 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 zearalenona con todos los grupos característicos libres y sin modificar, y por lo tanto disponibles para su reconocimiento por el sistema inmunitario durante la respuesta
20 inmunitaria y, en consecuencia, por los anticuerpos generados a partir de la misma. El fundamento de la invención reside en el descubrimiento de la capacidad de los conjugados con el esqueleto macrocíclico de zearalenona derivatizado a través del átomo de carbono del grupo metilo en C-3 del anillo lactónico, incorporando a dicha
25 posición un brazo espaciador hidrocarbonado de longitud diversa, 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 zearalenona con superiores prestaciones analíticas.

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

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

Y = $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{SH}$, $-\text{CH}_2\text{N}_3$

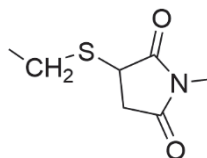
- 5 **T** y **L** tienen el significado que se indica a continuación para la fórmula (I).

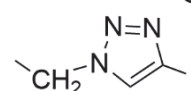
Cada uno de estos grupos **Y** se transforma en el correspondiente grupo **Z** de los compuestos de fórmula (I), de fórmula (II) o de fórmula (III) tras la conjugación:

Y = $-\text{COOH}$ se transforma en **Z** = $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$

Y = $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ se transforma en **Z** = $-\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$ o $-\text{CH}_2\text{NH}-$

10

Y = $-\text{CH}_2\text{SH}$ se transforma en **Z** =  o $-\text{CH}_2\text{S}-$

Y = $-\text{CH}_2\text{N}_3$ se transforma en **Z** = 

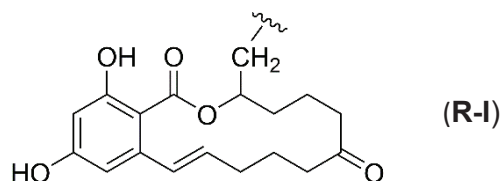
- 15 La presente invención se refiere a un compuesto que tiene una fórmula general (I)



donde

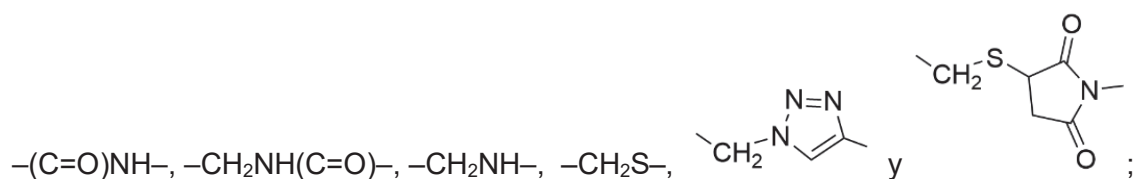
T es **R-I**,

20



L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 12 átomos de carbono;

Z es un grupo funcional seleccionado entre:



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

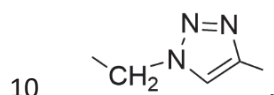
X está seleccionado entre **P** y **Q**, tal que

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.

L es preferiblemente una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 6 átomos de carbono.

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



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

No existe un límite superior para el peso molecular posible de **P**, solo inferior pues depende del sistema inmunitario. Por ejemplo, dicho límite puede ser de 2000 Dalton.

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.

m es preferiblemente un valor entre 1 y 20.

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



donde

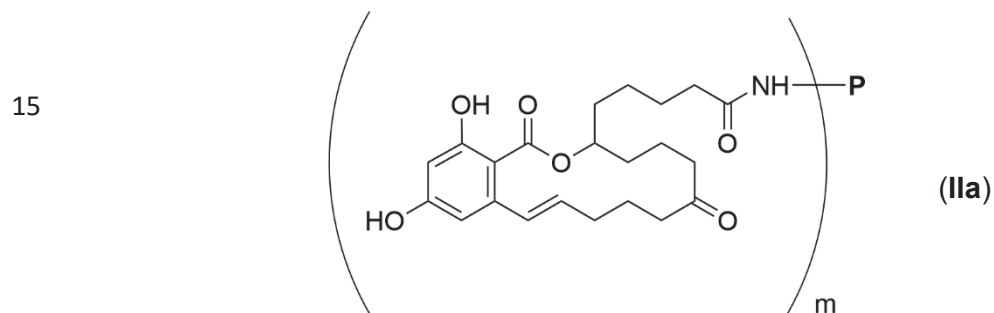
T, **L**, **Z** y **P** tienen los mismos significados dados anteriormente.

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

m es un número con un valor entre 1 y 100, preferiblemente entre 1 y 20.

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 o albúmina sérica.

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



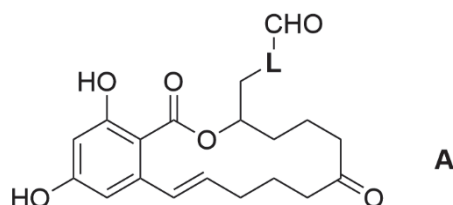
donde

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

El conjugado de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar el análogo funcionalizado de zearalenona de fórmula **T-L-Y** (hapteno), donde **T** y **L** se han definido anteriormente e **Y** es un grupo funcional seleccionado entre $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{SH}$ y $-\text{CH}_2\text{N}_3$, con **P**, un polipéptido natural o sintético de naturaleza no enzimática de peso molecular

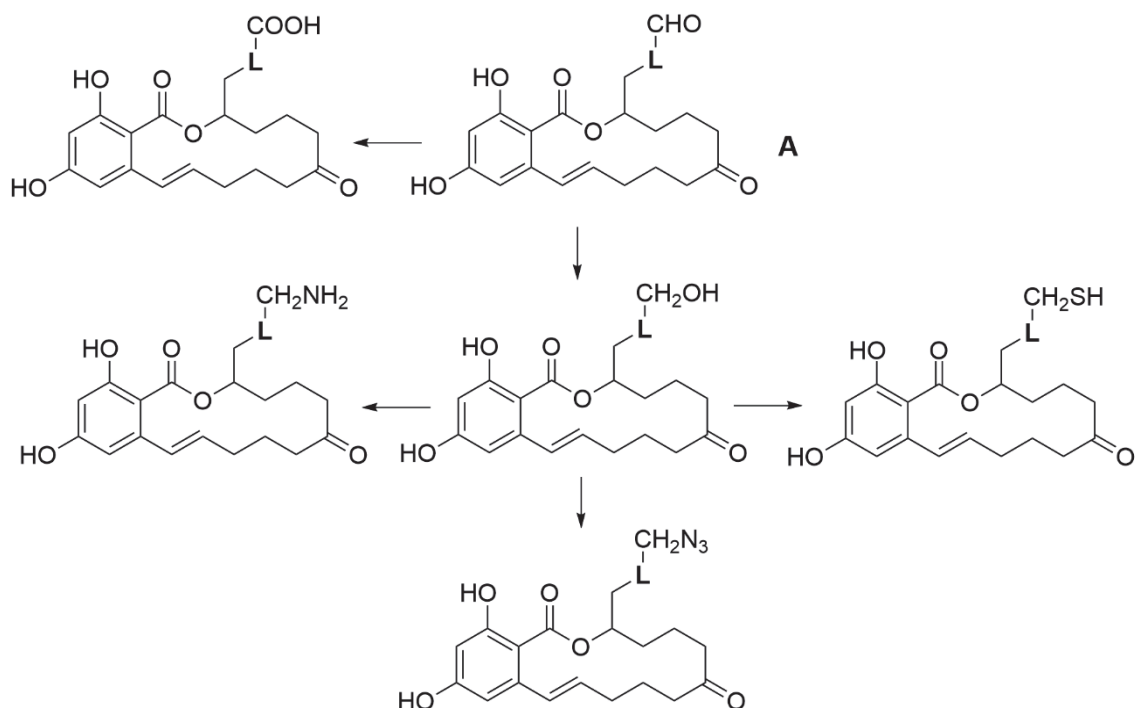
mayor de 2000 Dalton, por métodos ampliamente conocidos en la técnica (*Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 3ª Edición, Elsevier, Waltham, MA 02451, 2013*).

Los análogos funcionalizados de fórmula **T-L-Y** (haptenos), tal como se han definido previamente, se pueden obtener de modo general mediante síntesis química a través
 5 de una ruta sintética que implica como intermedio clave común el compuesto **A**



donde **L** tiene el mismo significado dado anteriormente para **I** y **II**.

A partir de este intermedio, el grupo -CHO se puede transformar fácilmente por métodos ampliamente conocidos en la técnica en cualquiera de los grupos funcionales definidos
 10 previamente como **Y**, un grupo funcional seleccionado entre -COOH, -CH₂NH₂, -CH₂SH y -CH₂N₃, tal y como se ilustra a continuación. Así, el grupo -CHO se puede oxidar directamente al grupo -COOH, con oxidantes como el clorito de sodio (NaClO₂), o reducirlo a un grupo -CH₂OH, con reductores tales como el borohidruro sódico (NaBH₄), para posteriormente transformar el grupo -CH₂OH en un grupo -CH₂NH₂,
 15 -CH₂SH o -CH₂N₃ mediante reacciones convencionales de sustitución nucleofílica alifática. Ejemplos de estas interconversiones de grupos funcionales, ilustradas en el siguiente esquema, se describen, por ejemplo, en *Chem.-Eur. J.* **2021**, 27, 8473–8478, para transformar -CH₂OH en -CH₂NH₂, *Synlett* **2000**, 908–910, para transformar -CH₂OH en -CH₂SH y *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 10013–10021, para transformar
 20 -CH₂OH en -CH₂N₃.

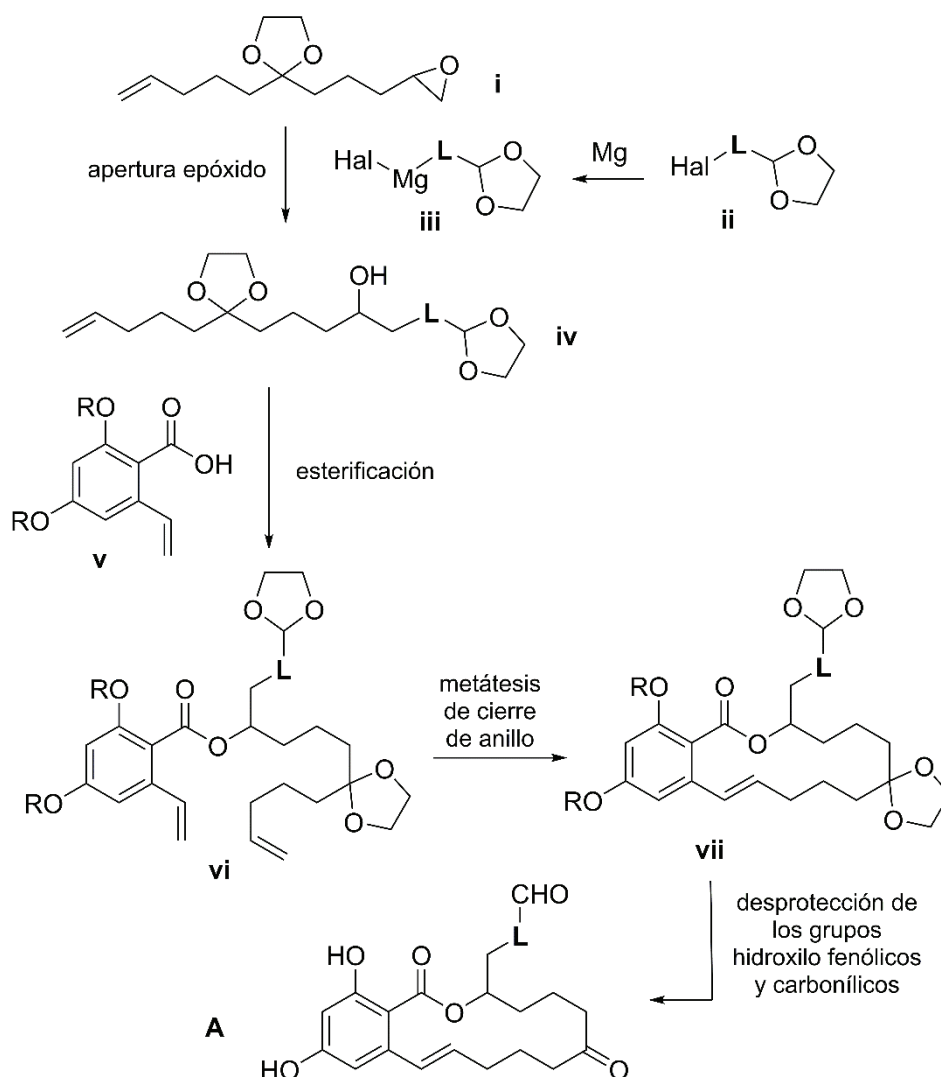


Tal como se ilustra en la siguiente figura, la síntesis del intermedio **A** puede efectuarse a partir del compuesto previamente conocido (**i**) (*J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7990–7995), mediante una serie de transformaciones sintéticas que se inician con la apertura

5 nucleofílica del grupo epóxido de (**i**) con un órgano magnesiano tal como (**iii**), en el que Hal es un halógeno (cloro, bromo o iodo), preparado a partir de la reacción del correspondiente haluro (**ii**) con magnesio en condiciones estándar de preparación de organomagnesianos. Los haluros de estructura general (**ii**), en la que **L** tiene el mismo significado dado anteriormente, son productos comerciales. La siguiente etapa de la

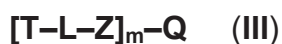
10 síntesis de **A** implica la reacción de esterificación de la agrupación hidroxílica del producto de la apertura del epóxido (**i**), el intermedio (**iv**), con el grupo carboxílico del ácido (**v**), en el que R es un grupo protector de las agrupaciones oxigenadas fenólicas, como pueden ser, por ejemplo, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ (MOM), $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ (MOEt), $-\text{CH}_2\text{Ph}$ (Bn) o $-\text{Si}^t\text{Bu}(\text{CH}_3)_2$ (TBDMS). El sistema macrocíclico lactónico del intermedio

15 **A** se completa a partir del éster (**vi**) mediante la conocida reacción de metátesis de cierre de anillo catalizada por complejos de rutenio (catalizadores de Grubbs), lo que conduce a la benzolactona (**vii**), a partir de la cual se completa la síntesis del intermedio **A** mediante reacciones de desprotección convencionales de las agrupaciones hidroxílicas fenólicas y carbonílicas.



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 zearalenona para determinar o detectar esta micotoxina en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo.

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 zearalenona **T-L-Y** definido anteriormente. Cuando el material portador es un marcador no isotópico detectable, el derivado del análogo de zearalenona es un compuesto de fórmula (III):



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

El valor de **m** en este caso indica el grado de marcaje, es decir, la relación molar entre la fracción derivada del fragmento **T-L-Z** y marcador no isotópico detectable **Q**, en el conjugado de fórmula (III) resultante.

m es un número con un valor entre 1 y 100, preferiblemente entre 1 y 20.

5 **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.

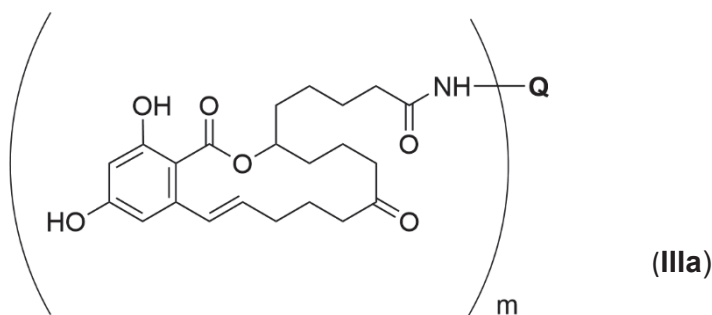
En la presente invención se entiende por "marcador" cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica analítica. En la presente
10 invención, **Q** identifica un fragmento de una molécula, o una molécula química detectora, marcadora o trazadora no isotópica.

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,
15 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 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
20 polipéptido, que actúa como catalizador de reacciones bioquímicas.

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)



5

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 zearalenona 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, Elsevier, Waltham, MA 02451, **2013**).

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

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”.

Para obtener anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia zearalenona, así como para desarrollar inmunoensayos para analizar dicha micotoxina, se han preparado análogos funcionalizados de zearalenona de fórmula **T-L-Y** (haptenos), es decir, análogos estructurales de esta molécula que incorporan un grupo funcional **Y** susceptible de ser utilizado para la conjugación a un portador **P** o marcador **Q**. Este grupo funcional está separado del sistema bicíclico de la molécula de zearalenona por un espaciador **L**. La posición por la que se une el espaciador **L** a la estructura de zearalenona determina la posición por la que produce la unión de ésta al portador **P** o marcador **Q** durante la conjugación a través del grupo funcional **Y**, condicionando la forma en que se expone la estructura de zearalenona al sistema inmunitario. Determinar cuál es la mejor posición de la estructura de zearalenona para incorporar el espaciador

L no es un aspecto obvio. En la presente invención se demuestra la viabilidad de los conjugados preparados mediante derivatización a través del átomo de carbono del grupo metilo en C-3 del anillo lactónico de zearalenona. Particularmente se demuestra la viabilidad de los conjugados de fórmula (II) como inductores de la producción de anticuerpos de afinidad y especificidad adecuadas frente a zearalenona, e incluso la viabilidad de los conjugados de fórmula (II) o de los 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 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 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 policlonal (o, lo que es lo mismo, antisuero), monoclonal, recombinante o un fragmento de anticuerpo.

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 anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos de la invención tienen alta afinidad y especificidad hacia zearalenona.

En una realización particular, la afinidad (IC_{50}) hacia zearalenona de los anticuerpos 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 nM y aún más preferentemente inferior a 1 nM y aún más preferentemente inferior a 0,2 nM.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención presentan unos valores de afinidad IC₅₀ hacia zearalenona 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.

- 5 Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un anticuerpo, obtenido a partir de conjugados de la invención, para el análisis *in vitro* de zearalenona. En particular el uso comprende poner en contacto una muestra que contiene zearalenona con dicho anticuerpo; y más específicamente comprende:

- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo definido anteriormente;
- 10 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).

- 15 Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un anticuerpo y un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) definido anteriormente para el análisis *in vitro* de zearalenona mediante ELISA competitivo. En particular, este uso comprende:

- a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-zearalenona y con el compuesto de fórmula (II) o el derivado marcado de fórmula (III) definido anteriormente;
- 20 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; y
- c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).

- 25 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un anticuerpo y un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) definido anteriormente para el análisis *in vitro* de zearalenona mediante cromatografía de flujo lateral. Preferiblemente, este uso comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo de la invención;
- 30 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)** mediante separación y concentración inmunocromatográfica.

Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso del anticuerpo definido anteriormente para la purificación y/o concentración de zearalenona de una muestra.

- 5 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 la zearalenona presente en dicha muestra. La elución posterior de la zearalenona retenida en el soporte por métodos ampliamente conocidos en la técnica (cambio de pH, modificación de la fuerza iónica, utilización de agentes caotrópicos) permitirá su purificación y/o concentración, en un sistema conocido como cromatografía de inmunoafinidad. En una realización preferida, este método comprende las siguientes etapas:
- 10

- a)** inmovilizar al menos un anticuerpo obtenido a partir de conjugados de fórmula **(II)** de la invención sobre un soporte;
- 15 **b)** hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que el anticuerpo retenga la zearalenona presente en dicha muestra; y
- c)** eluir la zearalenona retenida por el anticuerpo en el soporte.

- La determinación de la reacción inmunoquímica en el paso **(c)** se puede realizar mediante un ensayo competitivo, usando como competidor un compuesto de fórmula **(II)** o un derivado marcado de fórmula **(III)** como se ha definido anteriormente.
- 20

Un aspecto adicional de la presente invención también se refiere a un kit de detección de zearalenona que utiliza al menos un anticuerpo de la invención o un compuesto de fórmula **(II)** o de fórmula **(III)** tal como se describen en la presente solicitud de patente.

- Los usos descritos en la presente invención permiten la determinación cuantitativa o análisis cualitativo del contenido de la micotoxina zearalenona en una muestra.
- 25 Asimismo, los usos descritos en la presente invención permiten analizar el contenido de zearalenona en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de alimentos, como cereales, frutas y leche, 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 zearalenona en
- 30 cereales y sus derivados procesados.

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.

- 5 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).

- 10 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.

- 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 análogos funcionalizados de zearalenona de fórmula **T-L-Y** (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
- 25 producción de anticuerpos de afinidad y especificidad adecuadas hacia zearalenona, aptos para el desarrollo de un método inmunoanalítico eficaz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Curva estándar para zearalenona en el formato de ELISA competitivo directo con trazador enzimático homólogo usando el anticuerpo policlonal **Ila#2** producido a partir del conjugado BSA-Ila.

5

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 zearalenona y el desarrollo de un
 10 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.

1. Técnicas generales

15 **1.1.** Reactivos, equipos y técnicas generales utilizadas en la preparación de los haptenos y conjugados.

Todos los disolventes se purificaron por destilación y, si fue necesario, se secaron utilizando métodos estándar. Las reacciones sensibles al aire y la humedad se llevaron a cabo bajo una presión positiva de nitrógeno utilizando material previamente secado
 20 en horno a 130 °C durante la noche. Las reacciones se controlaron mediante cromatografía en capa fina con placas de gel de sílice de 0,25 mm. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta a 366 y 254 nm, utilizando una solución acuosa de molibdato cérico de amonio o una solución etanólica de ácido fosfomolibdico y calor como agentes de revelado. La cromatografía se refiere a la cromatografía en columna
 25 flash, que se realizó en gel de sílice 60 (tamaño de partícula 40–63 µm) con los solventes indicados en cada caso. Los espectros de RMN ¹H/¹³C se registraron a 25 °C, en el disolvente indicado, a 300/75 MHz (espectrómetro Bruker AvanceIII 300), 400/101 (espectrómetro Bruker AV400) o 500/126 MHz (Bruker Avance DRX500). Los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C (escala δ) se expresan en partes por millón (ppm)
 30 respecto del tetrametilsilano y se refieren al protón o carbono residual en el disolvente de RMN (CHCl₃: δ 7,26/77,16). Se utilizó una combinación de experimentos COSY,

HSQC y HMBC editados para asignar los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de los compuestos seleccionados. 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*.

- 5 Los datos obtenidos se expresan como relación masa/carga (m/z). 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 (AB Sciex MALDI-TOF/TOF), en modo lineal positivo (1500 disparos para cada posición) en un rango de masa de 12.000–100.000 m/z .

- 10 **1.2. Reactivos, equipos y técnicas generales utilizadas en la generación de anticuerpos y el desarrollo de inmunoensayos.**

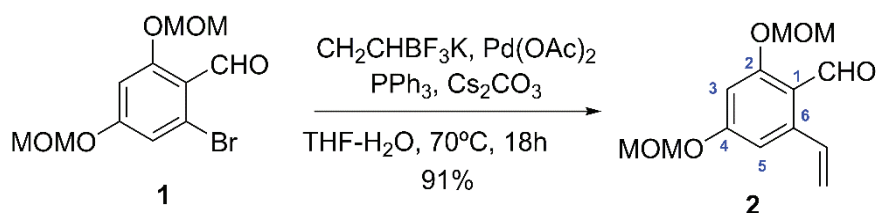
- Zearalenona y sus metabolitos de referencia se adquirieron de Fermentek (Jerusalem, Israel). La BSA (fracción V) fue de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). Sigma/Aldrich (Madrid, España) proporcionó OVA, HRP, suero bovino, adyuvantes de Freund y la *o*-fenilendiamina (OPD). Para la purificación de los conjugados de fórmula (II) y (III) se utilizaron columnas preempaquetadas de desalinización Sephadex G-25 HiTrap™ de GE Healthcare (Uppsala, Suecia) utilizando como tampón de elución fosfato sódico 100 mM, pH 7,4. Como anticuerpo de captura se usó, bien un anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de conejo (GAR) de Rockland Immunochemicals (Pottstown, PA, EE. UU.) o bien un anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de ratón (RAM) de Jackson ImmunoResearch Europe (Ely, UK). 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 lector de microplacas modelo 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.

2. Preparación de conjugados de fórmula (II)

Ejemplo 1: Preparación de conjugados de fórmula (II) para $\mathbf{T} = \mathbf{R-I}$, $\mathbf{L} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\mathbf{Z} = -(\text{C=O})\text{NH}-$ y $\mathbf{P} = \text{BSA}$ (seroalbúmina bovina) y OVA (ovalbúmina).

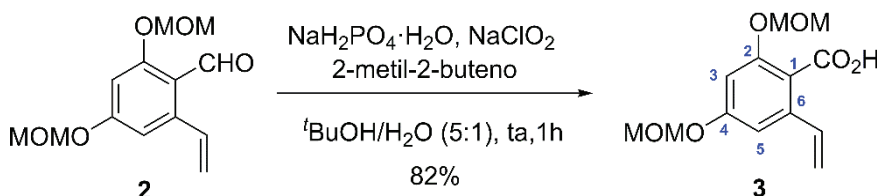
2.2. Preparación y activación del hapteno ZE-1.

2.2.1. Preparación de 2,4-bis(metoximetoxi)-6-vinilbenzaldehído (2).



Una mezcla de 2-bromo-4,6-bis(metoximetoxi)benzaldehído (**1**, 216,3 mg, 0,709 mmol),
 5 preparado como se describe en *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 2139–2180, viniltrifluoroborato de potasio (142,4 mg, 1,063 mmol), Cs_2CO_3 (1,39 g, 4,253 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (8,0 mg, 35,44 μmol) y PPh_3 (18,6 mg, 70,89 μmol) en una mezcla 9:1 previamente desgasificada de THF y agua (7 ml) se agitó a 70°C durante la noche bajo nitrógeno. La reacción se dejó enfriar, se trató con agua y se extrajo con AcOEt . Los extractos orgánicos
 10 combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida. El producto crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, usando CHCl_3 como eluyente, para dar el aldehído **2** (162,7 mg, 91%) como un aceite. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 10,51 (d, J = 0,6 Hz, 1H, CHO), 7,54 (dd, J = 17,4, 10,8 Hz, 1H, CH=), 6,82 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-5), 6,77 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-3), 5,62 (dd, J = 17,4, 1,4 Hz, 1H, $=\text{CH}_2$), 5,36 (dd, J = 10,9, 1,4 Hz, 1H, $=\text{CH}'_2$), 5,25 y 5,22 (cada una s, 2H cada una, $2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 3,50 y 3,48 (cada una s, 3H cada una, $2\times\text{OCH}_3$); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 190,6 (CHO), 162,4 (C-4), 162,2 (C-2), 143,2 (C-6), 136,1 (CH=), 117,7 ($=\text{CH}_2$), 117,6 (C-1), 108,2 (C-5), 102,1 (C-3), 95,0 y 94,2 ($2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 56,7 y 56,6 ($2\times\text{OCH}_3$); EMAR (TOF, ES+) m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 253,1071, encontrado 253,1071.
 20

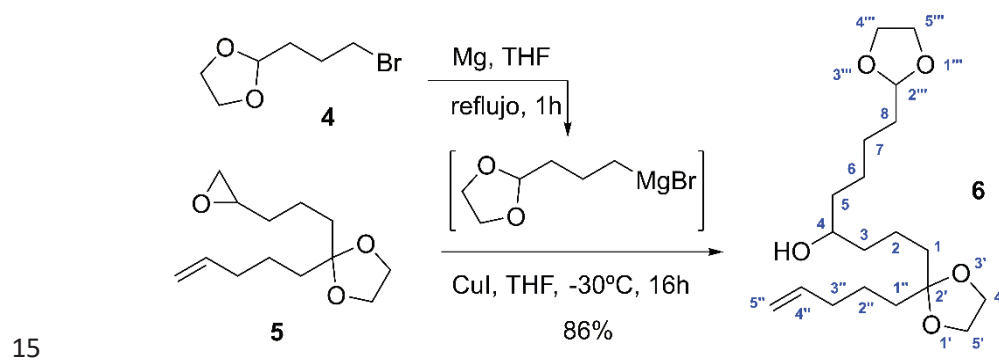
2.2.2. Preparación del ácido 2,4-bis(metoximetoxi)-6-vinilbenzoico (3).



Se agregaron 2-metil-2-buteno (432 μL , 286 mg, 4,078 mmol), $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (75,1 mg, 0,544 mmol) y NaClO_2 (66,6 mg, 0,736 mmol) a una solución del aldehído **2** (56,4 mg, 0,223 mmol) en una mezcla 5:1 de *tert*-butanol- H_2O (5,5 mL) a 0°C . La mezcla se agitó
 25

a esta temperatura durante 15 min y a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se trató con una solución acuosa saturada de NH_4Cl y se extrajo con AcOEt , los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida. La purificación cromatográfica del residuo obtenido, utilizando como eluyente hexano- AcOEt 7:3, condujo al ácido carboxílico **3** (48,9 mg, 82%). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,05 (dd, $J = 17,3, 10,9$ Hz, 1H, CH=), 6,92 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-5), 6,81 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 5,70 (dd, $J = 17,3, 0,9$ Hz, 1H, $=\text{CH}_2$), 5,36 (dd, $J = 10,9$ Hz, 0,9 Hz, 1H, $=\text{CH}'_2$), 5,24 y 5,21 (cada uno s, 2H cada uno, $2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 3,51 y 3,49 (cada uno s, 3H cada uno, $2\times\text{OCH}_3$); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 170,7 (CO_2H), 159,8 (C-4), 156,3 (C-2), 140,3 (C-6), 134,7 (CH=), 117,5 ($=\text{CH}_2$), 115,4 (C-1), 107,4 (C-5), 103,3 (C-3), 95,5 y 94,5 ($2\times\text{OCH}_2\text{O}$), 56,7 y 56,4 ($2\times\text{OCH}_3$); EMAR (TOF, ES+) m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 269,1020, encontrado 269,1020.

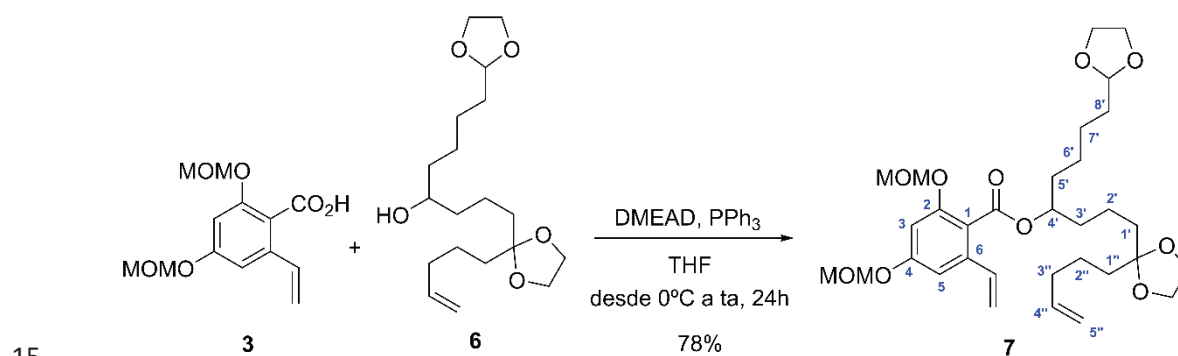
2.2.3. Preparación de 8-(1,3-dioxolan-2-il)-1-(2-(pent-4-en-1-il)-1,3-dioxolan-2-il)octan-4-ol (**6**).



Una disolución del bromuro **4** (1,137 mg, 5,83 mmol) en THF anhidro (8 mL) se añadió gota a gota durante 40 min a una suspensión agitada de virutas de magnesio (previamente trituradas en mortero y calentadas en un horno a 150 °C durante 30 min, 290 mg, 11,9 mmol) y un cristal de yodo en THF (6 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó en las mismas condiciones durante 30 min, se enfrió a -33 °C y se añadió vía cánula una solución de CuI (151,5 mg, 0,795 mmol) en THF (6 mL), y la mezcla se agitó durante 40 min más a la misma temperatura. A continuación, se añadió gota a gota una solución de epóxido **5** (600 mg, 2,65 mmol), preparado como se describe en *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7990–7995, en THF (5 mL) durante 15 min, durante los cuales la reacción se volvió negruzca. Una vez completada la adición, la reacción se agitó durante 20 h a -33 °C y luego se trató con una solución acuosa saturada de NH_4Cl y se agitó a temperatura ambiente

durante aproximadamente 30 min. La mezcla de reacción se diluyó con Et₂O, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄ anhidro. La purificación cromatográfica del residuo obtenido tras la evaporación del disolvente a presión reducida, utilizando mezclas de hexano-Et₂O (9:1, 7:3, 1:1, 3:7) como eluyente, condujo al alcohol secundario **6** (784 mg, 86%) como un aceite. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5,79 (ddt, *J* = 16,9, 10,2, 6,7 Hz, 1H, H-4''), 4,97 (m, 2H, H₂-5''), 4,84 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-2'''), 4,00–3,80 (m, 8H, H₂-4', H₂-5', H₂-4'', H₂-5''), 3,59 (m, 1H, H-4), 2,05 (ddt, *J* = 7,2, 7,1, 1,4 Hz, 2H, H₂-3''), 1,74–1,33 (m, 18H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 138,8 (C-4'), 114,8 (C-5'), 111,7 (C-2'), 104,7 (C-2'''), 71,8 (C-4), 65,1 y 64,9 (2xOCH₂CH₂O), 37,8 (C-3), 37,5 (C-1), 37,2 (C-5), 36,7 (C-1''), 34,1 (C-3''), 33,9 (C-8), 25,7 (C-6), 24,2 (C-7), 23,2 (C-2''), 20,1 (C-2); EMAR (TOF, ES+) *m/z* calculado para C₁₇H₂₉O₃ [(M-H₂O-C₂H₄O)+H]⁺ 281,2111, encontrado 281,2117.

2.2.4. Preparación de 2,4-bis(metoximetoxi)-6-vinilbenzoato de 8-(1,3-dioxolan-2-il)-1-(2-(pent-4-en-1-il)-1,3-dioxolan-2-il)octan-4-ilo (7**).**



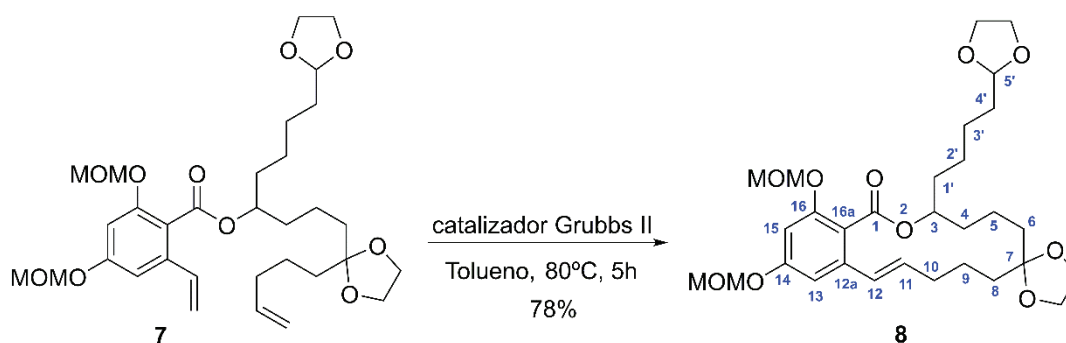
Una solución de azodicarboxilato de di-2-metoxietilo (DMEAD, 31,4 mg, 0,134 mmol) en THF anhidro (0,5 ml) se añadió gota a gota a una solución del ácido benzoico **3** (43,3 mg, 0,162 mmol), alcohol **6** (46,1 mg, 0,134 mmol) y PPh₃ (35,4 mg, 0,134 mmol) en THF (1,3 mL) a 0 °C bajo nitrógeno. La solución ligeramente amarillenta resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 24 h. Después de esto, la reacción se detuvo con una solución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con Et₂O, los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron al vacío. El crudo de reacción obtenido se purificó por cromatografía, usando mezclas de hexano-AcOEt de 95:5 a 7:3, para obtener el benzoato **7** (62,2 mg, 78%) como un aceite amarillento. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-3), 6,77 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-5), 6,72 (dd, *J* = 17,4, 10,9 Hz, 1H, =CH Ar), 5,79 (ddt, *J* = 16,9, 10,2, 6,6 Hz, 1H, H-4''), 5,71 (dd, *J* = 17,4, 1,0 Hz, 1H,

20

25

=CH₂ Ar), 5,32 (dd, $J = 10,9, 1,0$ Hz, 1H, =CH'₂ Ar), 5,17 y 5,16 (cada uno s, 2H cada uno, 2xOCH₂O), 5,14 (m, 1H, H-4'), 5,04–4,91 (m, 2H, H₂-5''), 4,84 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H, OCHO), 3,98–3,81 (m, 8H, 2xOCH₂CH₂O), 3,47 y 3,45 (cada uno s, 3H cada uno, 2xOCH₃), 2,04 (dt, $J = 7,0, 6,9, 1,4$ Hz, 2H, H₂-3''), 1,72–1,36 (m, 18H, 9xCH₂); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 167,6 (CO₂), 158,8 (C-4), 155,2 (C-2), 138,8 (C-4''), 137,4 (C-6), 133,6 (=CH Ar), 118,6 (OCO), 117,4 (=CH₂ Ar), 114,8 (C-5''), 111,6 (C-1), 105,7 (C-3), 104,6 (OCHO), 103,0 (C-5), 94,6 y 94,5 (2xOCH₂O), 75,4 (C-4'), 65,1 y 65,0 (2xOCH₂CH₂O), 56,2 (2xOCH₃), 37,2 (C-1'), 36,8 (C-1''), 34,6, 34,3, 34,1 y 34,0 (C-3'', C-3', C-5' y C-8'), 25,4, 24,2 y 23,2 (C-2'', C-6' y C-7'), 19,8 (C-2'); EMAR (TOF, ES+) m/z calculado para C₃₂H₄₉O₁₀ [M+H]⁺ 593,3320, encontrado 593,3322.

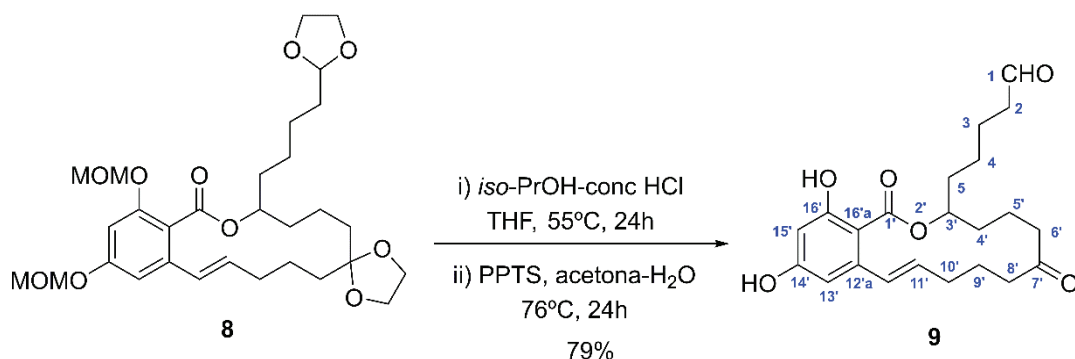
2.2.5. Preparación de (E)-3-(4-(1,3-dioxolan-2-il)butil)-14,16-bis(metoximetoxi)-3,4,5,6,9,10-hexahidro espiro[benzo[c][1]oxacictetradecina-7,2'-[1,3]dioxolano]-1(8H)-ona (**8**).



Una solución del dieno **7** (52,0 mg, 87,8 μ mol) y catalizador de segunda generación de Grubbs (7,4 mg, 8,9 μ mol) en tolueno anhidro (20 mL) se agitó a 80 °C durante 5 h bajo nitrógeno. La mezcla de reacción oscura resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente, se concentró a sequedad bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna, utilizando mezclas de CH₂Cl₂ y acetona de 99:1 a 97:3 como eluyente, para obtener la lactona macrocíclica **8** (38,4 mg, 78%) como un aceite incoloro. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,83 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-13), 6,71 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-15), 6,45 (dt, $J = 16,1, 1,7$ Hz, 1H, H-12), 6,27 (dt, $J = 16,1, 5,6$ Hz, 1H, H-11), 5,20–5,10 (m, 5H, H-3, 2xOCH₂O), 4,83 (t, $J = 4,7$ Hz, 1H, CH-5), 3,78–3,80 (m, 8H, 2xOCH₂CH₂O), 3,46 y 3,44 (cada uno s, 3H cada uno, 2xOCH₃), 2,42–2,08 (m, 2H, H₂-10), 1,85–1,37 (m, 18H, 9xCH₂); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 168,1 (CO₂), 158,6 (C-14), 154,8 (C-16), 136,9 (C-12a), 133,4 (C-11), 125,8 (C-12), 118,7 (C-7), 112,1 (C-16a), 105,3 (C-13), 104,6 (C-5'), 102,2 (C-15), 94,7 y 94,5 (2xOCH₂O), 74,9 (C-3), 65,0

(OCH₂CH₂O), 64,5 y 64,3 (OCH₂CH₂O), 56,3 y 56,2 (2xOCH₃), 35,5 y 34,4 (C-6 y C-8), 34,0, 33,9 y 33,1 (C-1', C-4' y C-4), 30,2 (C-10), 25,5 y 24,1 (C-2' y C-3'), 21,2 y 19,8 (C-5 y C-9); EMAR (TOF, ES+) *m/z* calculado para C₃₀H₄₅O₁₀ [M+H]⁺ 565,3007, encontrado 565,3021.

5 2.2.6. Preparación de (*E*)-5-(14,16-dihidroxi-1,7-dioxo-3,4,5,6,7,8,9,10-octahidro-1H-benzo[*c*][1]oxaciclotetradecina-3-il)pentanal (**9**).

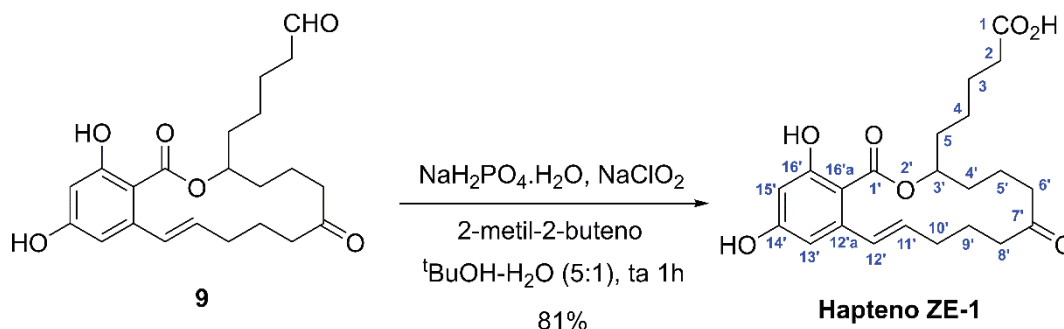


Una mezcla 10:1 de alcohol isopropílico y ácido clorhídrico concentrado (850 μ L) se añadió a una solución del diacetal **8** (37,5 mg, 66,4 μ mol) en THF (2,6 mL) y la mezcla se agitó a 55 °C durante 24 h. bajo nitrógeno. Pasado este tiempo, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se trató con una solución acuosa al 10% de NaHCO₃ (3 mL), se diluyó con agua y se extrajo con Et₂O. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró a presión reducida.

El crudo obtenido anteriormente (37,4 mg) y PPTS (31,2 mg, 124 μ mol) se disolvieron en una mezcla 10:1 de acetona y agua (1,8 mL) y la solución resultante se calentó con agitación a 60 °C durante 24 h bajo nitrógeno. La mezcla de reacción enfriada se diluyó con AcOEt, se lavó con una solución acuosa al 5% de NaHCO₃ y salmuera y se secó sobre MgSO₄ anhidro. El residuo obtenido tras la evaporación del disolvente a presión reducida se cromatografió sobre gel de sílice, usando hexano-AcOEt como eluyente, para dar el aldehído **9** (20,4 mg, 79%) como un sólido blanco amorfo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 11,98 (s, 1H, 16'-OH), 9,75 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, CHO), 7,04 (dd, *J* = 15,3, 2,1 Hz, 1H, H-12'), 6,40 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H, H-13'), 6,35 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H, H-15'), 5,65 (ddd, *J* = 15,3, 10,7, 3,4 Hz, 1H, H-11'), 5,00 (dt, *J* = 6,5, 5,4 Hz, 1H, H-3'), 2,85 (ddd, *J* = 19,1, 12,7, 2,6 Hz, 1H, H-8'), 2,62 (dt, *J* = 12,3, 4,5 Hz, 1H, H-6'), 2,45 (ddd, *J* = 8,3, 6,4, 1,5 Hz, 2H, H₂-2), 2,37 (dt, *J* = 14,4, 3,6 Hz, 1H, H-10'), 2,21–2,09 (m, 4H, H'-6', H'-8', H-9', H'-10'), 1,81–1,59 (m, 8H, H₂-3, H₂-4', H₂-5, H₂-5'), 1,51–1,34 (m, 3H, H₂-4, H'-9'); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 211,6 (C-7'), 202,6 (CHO), 171,5 (C-1'), 165,6 (C-14'),

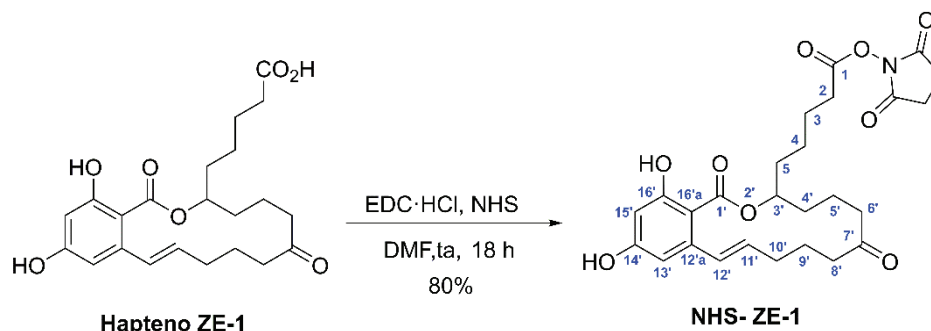
160,9 (C-16'), 144,3 (C-12'a), 133,23 (C-12'), 133,19 (C-11'), 108,7 (C-13'), 103,8 (C-16'a), 102,6 (C-15'), 76,2 (C-3'), 43,8 (C-2), 43,2 (C-6'), 36,9 (C-8'), 34,7 (C-4'), 32,5 (C-5), 31,1 (C-10'), 24,6 (C-3), 22,5 (C-4), 22,0 (C-5'), 21,1 (C-9'); EMAR (TOF, ES+) m/z calculado para $C_{22}H_{29}O_6$ $[M+H]^+$ 389,1959, encontrado 389,1959.

5 2.2.7. Preparación del ácido (*E*)-5-(14,16-dihidroxi-1,7-dioxo-3,4,5,6,7,8,9,10-octahidro-1*H*-benzo[*c*][1] oxaciclotetradecina-3-il)pentanoico (**Hapteno ZE-1**).



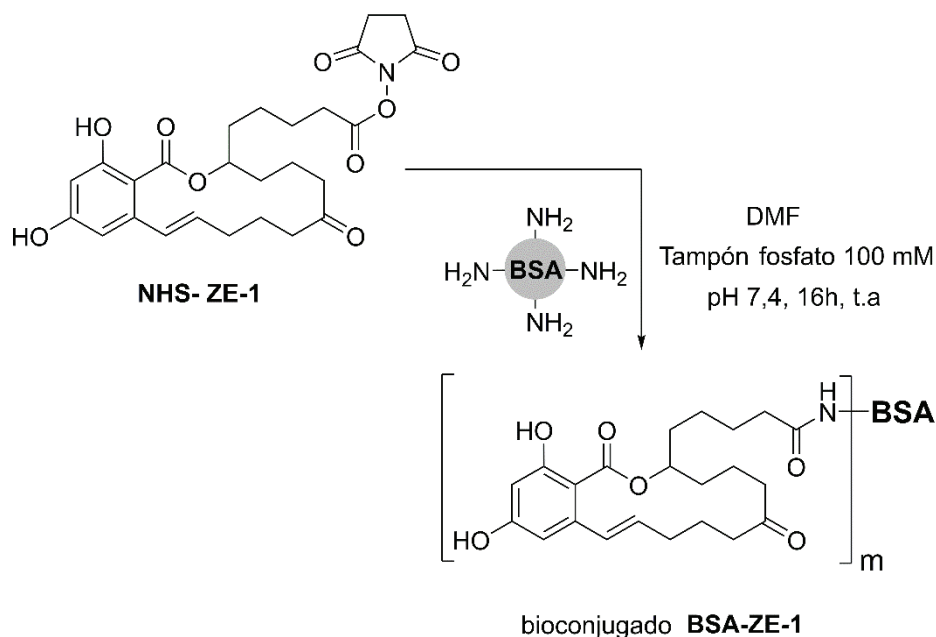
2-Metil-2-butenol (94 μL , 0,86 mmol), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (14,5 mg, 0,117 mmol) y NaClO_2 (12,9 mg, 0,14 mmol) se añadieron a una disolución del aldehído **9** (16,7 mg, 43,1 μmol) en una mezcla 5:1 de *tert*-BuOH- H_2O (1,3 mL) a 0 °C. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h, luego se trató con una solución acuosa saturada de NH_4Cl y se extrajo con AcOEt. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida para dar un residuo oleoso (17,2 mg) que se cromatografió en una columna corta de gel de sílice, usando CHCl_3 -MeOH 95:5 como eluyente, para obtener el hapteno **ZE-1** (14,1 mg, 81%) como un semisólido blanco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 11,99 (s, 1H, 16'-OH), 7,05 (dd, J = 15,3, 2,0 Hz, 1H, H-12'), 6,41 (d, J = 2,6 Hz, 1H, H-13'), 6,36 (d, J = 2,6 Hz, 1H, H-15'), 5,65 (ddd, J = 15,3, 10,7, 3,4 Hz, 1H, H-11'), 5,00 (dt, J = 6,7, 6,7 Hz, 1H, H-3'), 2,86 (ddd, J = 19,0, 12,7, 2,6 Hz, 1H, H-8'), 2,63 (dt, J = 12,3, 4,3 Hz, 1H, H-6'), 2,41–2,36 (m, 1H, H-10'), 2,35 (t, J = 7,3 Hz, 2H, H_2 -2), 2,22–2,09 (m, 4H, H'-6', H'-8', H-9', H'-10'), 1,81–1,59 (m, 8H, H_2 -3, H_2 -4', H_2 -5, H_2 -5'), 1,52–1,34 (m, 3H, H_2 -4, H'-9'); RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 212,0 (C-7'), 178,5 (CO_2H), 171,5 (C-1'), 165,6 (C-14'), 160,9 (C-16'), 144,3 (C-12'a), 133,3 (C-12'), 133,1 (C-11'), 108,7 (C-13'), 103,8 (C-16'a), 102,6 (C-15'), 76,3 (C-3'), 43,2 (C-6'), 37,0 (C-8'), 34,5 (C-4'), 33,7 (C-2), 32,5 (C-5), 31,1 (C-10'), 24,6 y 24,5 (C-3 y C-4), 22,5 (C-5'), 21,1 (C-9'); EMAR (TOF, ES+) m/z calculado para $C_{22}H_{29}O_7$ $[M+H]^+$ 405,1908, encontrado 405,1894.

2.2.8. Activación del hapteno **ZE-1** para su conjugación a polipéptidos (**P**) y marcadores (**Q**). Preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno **ZE-1** (**NHS-ZE-1**).



Una solución del hapteno **ZE-1** (7,4 mg, 17,7 μmol), clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (3,8 mg, 19,8 μmol , 1,1 equiv) y *N*-hidroxisuccinimida (2,5 mg, 21,7 μmol , 1,2 equiv) en DMF anhidra (300 μL) se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (18 h) bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se diluyó con Et_2O y se lavó sucesivamente con una disolución acuosa al 5% de NaHCO_3 , una solución acuosa al 1,5% de LiCl y salmuera, se secó sobre MgSO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para dar el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno **ZE-1** (**NHS-ZE-1**, 7,1 mg, 80%) como un aceite. El éster activo **NHS-ZE-1** así obtenido, cuyo RMN de ^1H mostró que contenía un pequeño porcentaje de DMF y BHT (estabilizante proveniente del Et_2O utilizado en la extracción), se utilizó directamente sin purificación adicional para la preparación de los correspondientes conjugados. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 11,95 (s, 1H, 16'-OH), 7,05 (dd, $J = 15,3, 1,5$ Hz, 1H, H-12'), 6,39 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, H-13'), 6,34 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, H-15'), 5,65 (ddd, $J = 15,3, 10,6, 3,6$ Hz, 1H, H-11'), 5,02 (m, 1H, H-3'), 2,83 (s ancho, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2,88–2,77 (m solapado con s ancho a 2,83, 1H, H-8'), 2,62 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, H_2-2), 2,56–2,66 (m solapado con t ancho a 2,62, 1H, H-6'), 2,42–2,31 (m, 1H, H-10'), 2,24–2,07 (m, 4H, H'-6', H'-8', H'-9', H'-10'), 1,85–1,59 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$), 1,54–1,41 (m, 3H).

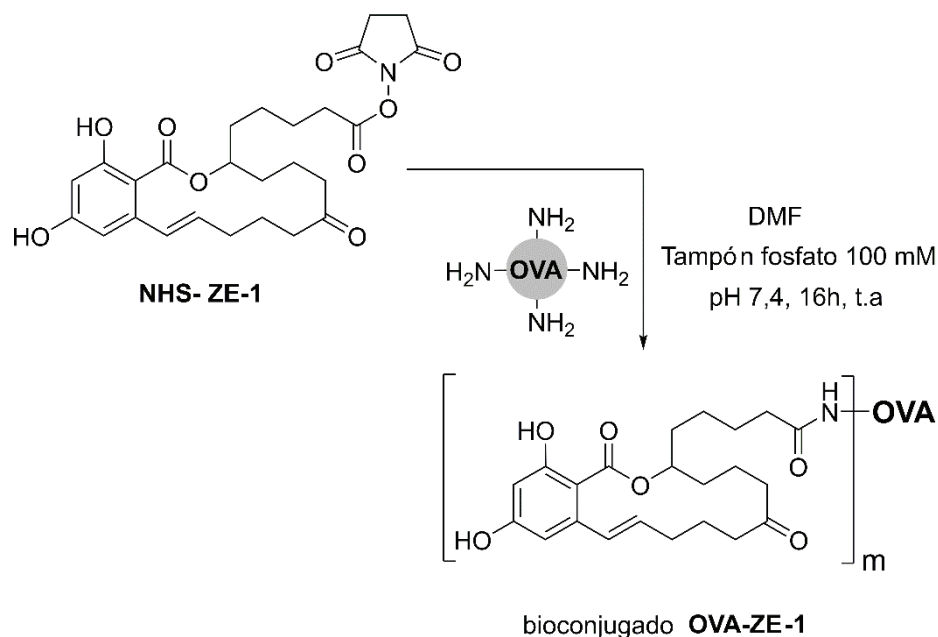
2.3. Preparación de conjugados del hapteno ZE-1 con BSA (BSA-ZE-1).



109 μL de una disolución 50 mM del éster activo NHS-ZE-1 en DMF (5,5 μmol) se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 0,8 mL de una disolución de BSA a 15 mg/mL (0,18 μmol) en tampón fosfato 100 mM, pH 7,4. La reacción de conjugación se incubó durante 16 h con agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el conjugado se purificó 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. Tras la 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 la determinación del grado de conjugación (m) obtenido en el conjugado, una alícuota de 100 μL del conjugado BSA-ZE-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 (ZE-1) conjugadas por molécula de BSA se determinó mediante MALDI-TOF-MS ($m = 14,4$, ver Tabla 1, entrada 1).

2.4. Preparación de conjugados del hapteno AL-1 con OVA (OVA-AL-1).

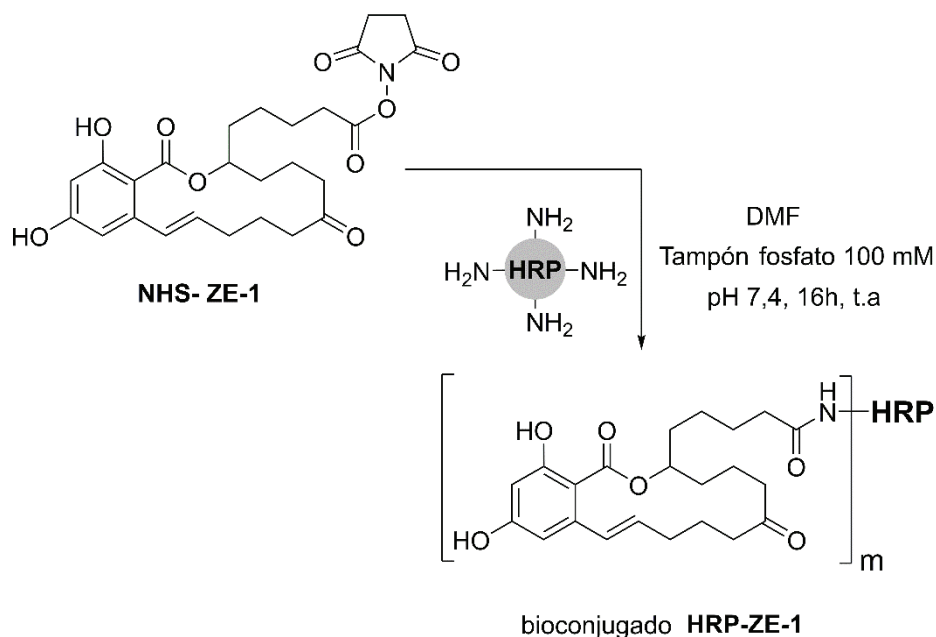


122 μL de una disolución 50 mM del hapteno activado NHS-ZE-1 en DMF (6,1 μmol), se añadieron lentamente y con agitación constante a un volumen de 1,8 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón fosfato 100 mM, pH 7,4 (0,61 μmol). Después de 16 h de reacción en agitación suave y a temperatura ambiente, el conjugado formado se purificó 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 (ZE-1) acoplados a la proteína mediante MALDI-TOF-MS ($m = 4,2$, ver Tabla 1, entrada 2).

3. Preparación de conjugados de fórmula (III)

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

3.1. Preparación de un conjugado del hapteno ZE-1 con HRP (HRP-ZE-1).



41 μ L de una disolución 15 mM del hapteno activado NHS-ZE-1 en DMF (0,61 μ mol), 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 fosfato 100 mM, pH 7,4 (0,061 μ mol). La reacción de conjugación se incubó durante 16 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el conjugado se purificó por exclusión molecular en 2 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. Tras la purificación, las fracciones recogidas que contenían el conjugado de HRP se llevaron a una concentración de 460 μ g/mL con tampón PBS (10 mM fosfato, pH 7,4, con 140 mM NaCl) con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenó a 4 °C. Una alícuota del conjugado HRP-ZE-1 recién obtenido se dializó y liofilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número de moléculas de hapteno (ZE-1) acoplados a la proteína mediante MALDI-TOF-MS ($m = 1,1$, ver Tabla 1, entrada 3).

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

Conjugado	RM_0	m/z proteína (P)/enzima (Q) de referencia		m/z	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/\text{hapteno}$	m
1 BSA-ZE-1	30	67.049		72.623	5.574	386,2	14,4
2 OVA-ZE-1	10	25.273 [#]		26.092 [#]	819	386,2	4,2
3 HRP-ZE-1	10	43.729		44.163	434	386,2	1,1

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

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

$\Delta(m/z)$: $(m/z \text{ conjugado}) - (m/z \text{ proteína o enzima de referencia})$

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

[#] 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 anticuerpo inmovilizado mediante anticuerpo de
5 captura, con detección directa (formato directo) y trazadores enzimáticos homólogos, es decir, un derivado marcado de zearalenona preparado a partir del conjugado de fórmula (IIIa) en el que **Q** es peroxidasa de rábano picante (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,
10 Winooski, EE.UU.).

Las placas se tapizaron con 100 μL por pocillo de una disolución de anticuerpo de captura (GAR o GAM) a 1 $\mu\text{g/mL}$ en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, mediante incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavaron las placas y se añadió 100 μL por pocillo de una disolución de anticuerpo policlonal o
15 anticuerpo monoclonal a diferentes concentraciones en PBST (10 mM fosfato, pH 7,4, con 140 mM NaCl y 0,05% Tween 20), y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50 μL por pocillo de una disolución estándar del analito en PBS seguido de 50 μL por pocillo de trazador enzimático en PBST, que es un derivado de fórmula (IIIa) donde **Q** es HRP, a diversas
20 concentraciones. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura

ambiente y después se lavaron las placas. A continuación, la actividad peroxidasa retenida se reveló con 100 μ L por pocillo de una disolución de 2 mg/mL de OPD en tampón 25 mM citrato y 62 mM fosfato, pH 5,4, que contenía 0,012% (v/v) de H_2O_2 . Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100 μ L por pocillo de ácido sulfúrico 1 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 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 fosfato 100 mM, pH 7,4 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 150×10^3 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).

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 zearalenona tanto en su forma libre como su forma de derivado conjugado. 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 zearalenona e inhibición de la señal igual o superior al 80% en el ensayo en presencia de zearalenona. 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 zearalenona a 10 y 100 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 añadiendo 50

μL por pocillo de la correspondiente dilución de sobrenadante y 50 μL de la disolución de zearelenona en PBS a la concentración de 0, 10 y 100 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 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 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 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.

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 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 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 $0,45\text{ }\mu\text{m}$) 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 µg/mL en PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,01% (p/v), que se almacenó a 4 °C.

- 5 La disolución restante se precipitó con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)], lo cual garantiza su estabilidad a 4 °C durante años.

7. Resultados

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

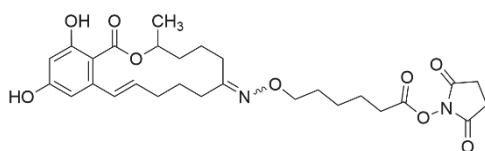
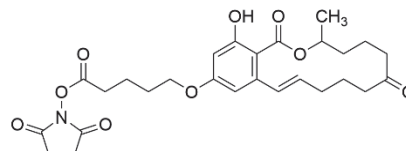
- Cada uno de los antisueros obtenidos se ensayó frente al antígeno de ensayo homólogo usando el ensayo de tipo ELISA competitivo en el formato de conjugado inmovilizado. Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno de ensayo frente a diferentes concentraciones de anticuerpo utilizando como competidor varias concentraciones de zearalenona o sus metabolitos preparadas por dilución seriada. Los antisueros procedentes de animales inmunizados con este inmunógeno presentaron una elevada
- 10 Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno de ensayo frente a diferentes concentraciones de anticuerpo utilizando como competidor varias concentraciones de zearalenona o sus metabolitos preparadas por dilución seriada. Los antisueros procedentes de animales inmunizados con este inmunógeno presentaron una elevada
- 15 afinidad hacia zearalenona, con valores de IC_{50} inferiores a 2 nM. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de una curva de inhibición de zearalenona con el antisuero **Ila#2**.

- Los valores de IC_{50} obtenidos en ensayo competitivo, utilizando el trazador enzimático homólogo de estructura (**Illa**) donde **Q** es HRP, para zearalenona de los dos antisueros obtenidos con el conjugado de fórmula (**Ila**) donde **P** es BSA se muestran en la Tabla 2.
- 20 En cuanto a la especificidad de los nuevos anticuerpos, los valores de reactividad cruzada con los metabolitos de zearalenona se recogen en la Tabla 3. La reactividad cruzada es el cociente entre el valor de IC_{50} para zearalenona y el valor de IC_{50} para otro metabolito, expresado en porcentaje. A efectos comparativos, en ambas tablas se aportan tanto la afinidad hacia zearalenona (Tabla 2) como la reactividad cruzada hacia
- 25 sus metabolitos (Tabla 3) de cuatro antisueros obtenidos de forma análoga a partir de inmunógenos previamente conocidos, en los que la proteína se encuentra unida al esqueleto de zearalenona por posiciones diferentes que en el conjugado de fórmula (**Ila**), en particular, a través de las posiciones en C-7 y C-14 (Abad-Fuentes et al., *Toxins* **2022**, 14, 185).

TABLA 2. Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo utilizando el correspondiente trazador enzimático homólogo (n = 3).

Antisuero	[HRP] (ng/mL)	Dilución antisuero ($\times 10^3$)	IC ₅₀ zearalenona (nM)
Ila#1^a	10	5	1,8
Ila#2^a	10	15	1,2
ZEo#1^b	100	5	3,1
ZEo#2^b	10	5	7,1
ZEp#1^c	10	5	11,5
ZEp#2^c	30	5	14,1

^a Antisueros obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado BSA–ZE-1 [conjugado de fórmula (IIa) donde **P** = BSA]; ^b Antisueros comparativos obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado de BSA con el éster activo NHS-ZEo (Abad-Fuentes *et al.*, *Toxins* **2022**, 14, 185); ^c Antisueros comparativos obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado de BSA con el éster activo NHS-ZEp (Abad-Fuentes *et al.*, *Toxins* **2022**, 14, 185).

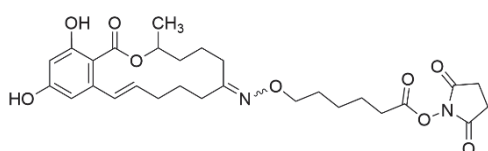
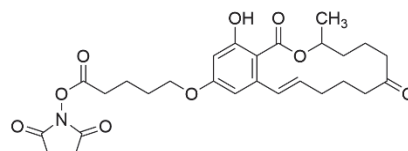
**NHS-ZEo****NHS-ZEp**

Estos resultados muestran que los inmunógenos obtenidos a partir de conjugados funcionalizados en las posiciones C-7 o C-14, descritas en la bibliografía, proporcionan antisueros (**ZEo#1**, **ZEo#2**, **ZEp#1** y **ZEp#2**) con afinidad hacia zearalenona inferior o muy inferior (mayor IC₅₀) que los producidos por el conjugado de fórmula (IIa) donde **P** es BSA descrito en esta invención.

TABLA 3. Valores de reactividad cruzada (%) de los antisueros en formato ELISA competitivo utilizando el correspondiente trazador enzimático homólogo (n = 3).

Antisero	Analito ^a					
	ZEN	ZAN	α -ZEL	β -ZEL	α -ZAL	β -ZAL
Ila#1^b	100	3,1	0,8	5,6	0,1	0,3
Ila#2^b	100	5,9	1,0	9,0	0,7	1,0
ZEO#1^c	100	32,7	47,9	13,9	17,3	5,1
ZEO#2^c	100	25,3	65,8	26,0	32,0	10,4
ZE#1^d	100	27,3	4,6	0,1	0,9	0,1
ZE#2^d	100	33,9	2,1	0,1	0,6	0,1

^a ZEN: zearalenona; ZAN: zearalanona; α -ZEL: α -zearalenol; β -ZEL: β -zearalenol; α -ZAL: α -zearalanol; β -ZAL: β -zearalanol. ^b Antisueros obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado BSA-ZE-1 [conjugado de fórmula (IIa) donde **P** = BSA]; ^c Antisueros comparativos obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado de BSA con el éster activo NHS-ZEO (Abad-Fuentes *et al.*, *Toxins* **2022**, 14, 185); ^d Antisueros comparativos obtenidos de la inmunización de dos conejos (#1 y #2) con el conjugado de BSA con el éster activo NHS-ZEp (Abad-Fuentes *et al.*, *Toxins* **2022**, 14, 185).

**NHS-ZEO****NHS-ZEp**

Por otro lado, los antisueros obtenidos con el inmunógeno de fórmula (IIa) donde **P** es BSA son específicos de zearalenona, mientras que los obtenidos con los inmunógenos comparativos reconocieron otros metabolitos, con reactividades cruzadas elevadas para muchos de ellos. Estos resultados confirman que los conjugados inmunogénicos de fórmula (IIa) en los que el esqueleto de zearalenona se une a la proteína portadora a través del grupo metilo en C-3, y que por tanto deja libres todos los grupos químicos característicos de esta micotoxina, dan lugar a anticuerpos de mayor afinidad y especificidad hacia zearalenona.

7.2. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a zearalenona

Para demostrar de manera más concluyente la idoneidad del conjugado de fórmula (IIa) para la obtención de anticuerpos monoclonales de elevada afinidad hacia zearalenona,

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 8 líneas celulares (hibridomas) productoras de anticuerpos monoclonales con elevada afinidad hacia zearalenona 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#14, IIa#15, IIa#19, IIa#36, IIa#38, IIa#116, IIa#312 y IIa#327 (anticuerpos monoclonales obtenidos a partir del conjugado de fórmula IIa).

7.2.1. Determinación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales

Una vez purificados por cromatografía de inmunoafinidad los 8 anticuerpos monoclonales obtenidos, se determinó su afinidad hacia zearalenona mediante ELISA competitivo directo con trazador enzimático homólogo, es decir, el derivado marcado de fórmula (IIIa) donde **Q** es HRP. Cada anticuerpo monoclonal se ensayó a dos concentraciones (100 y 1000 ng/mL) frente a diferentes concentraciones de trazador (10, 30, 100 y 300 ng/mL). Los valores de IC_{50} para zearalenona de cada anticuerpo monoclonal se muestran en la Tabla 4 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 zearalenona, y por tanto una afinidad mayor. En dicho formato de ensayo los mejores anticuerpos mostraron valores de IC_{50} para zearalenona por debajo de 0,5 nM, siendo el anticuerpo con mayor afinidad de entre los producidos a partir del conjugado de fórmula (IIa) el mAb IIa#19 ($IC_{50} = 0,1$ nM).

TABLA 4. Resultados de los ensayos en formato ELISA competitivo utilizando el correspondiente trazador enzimático homólogo (n = 3).

Anticuerpo monoclonal	[HRP] (ng/mL)	mAb (ng/mL)	IC_{50} zearalenona (nM)
IIa#14	30	100	0,3
IIa#15	30	1000	0,9
IIa#19	30	100	0,1
IIa#36	100	1000	1,0
IIa#38	100	100	0,2
IIa#116	100	100	1,7
IIa#312	100	1000	1,7
IIa#327	100	100	0,3

Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto que los conjugados de fórmula **(IIa)** objeto de esta invención son más aptos para obtener anticuerpos monoclonales de muy elevada afinidad y especificidad frente a zearalenona, y por lo tanto son más adecuados para su implementación en diferentes plataformas inmunoanalíticas que permitan la

5 determinación o cuantificación de zearalenona a los niveles de sensibilidad más exigentes.

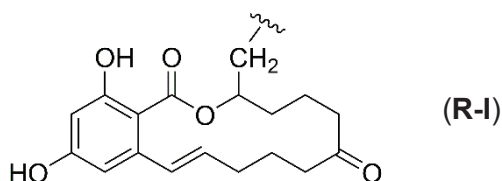
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



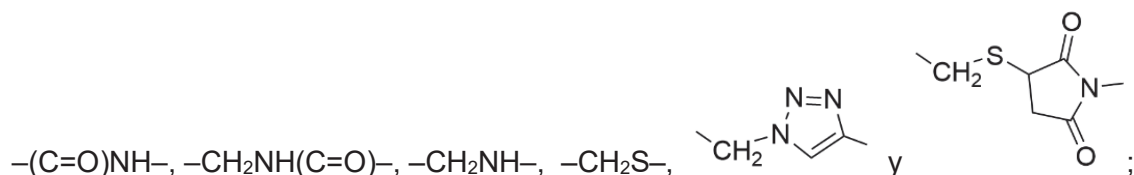
donde

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



10 donde **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 12 átomos de carbono;

Z es un grupo funcional seleccionado entre:



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

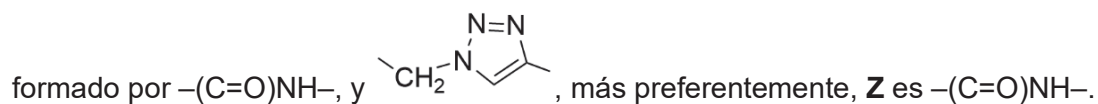
X está seleccionado entre **P** y **Q**, tal que

15 **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 0 a 6 átomos de carbono.

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



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.

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

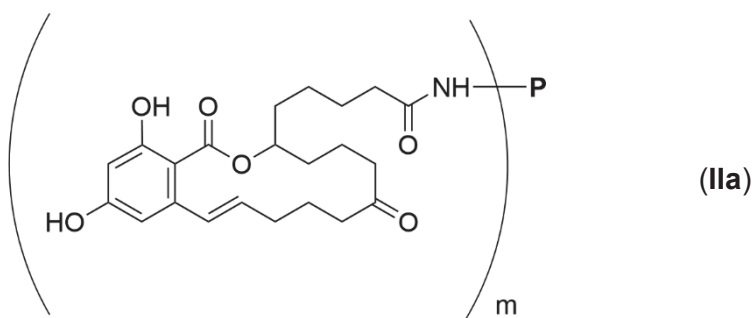


donde

10 **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.

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

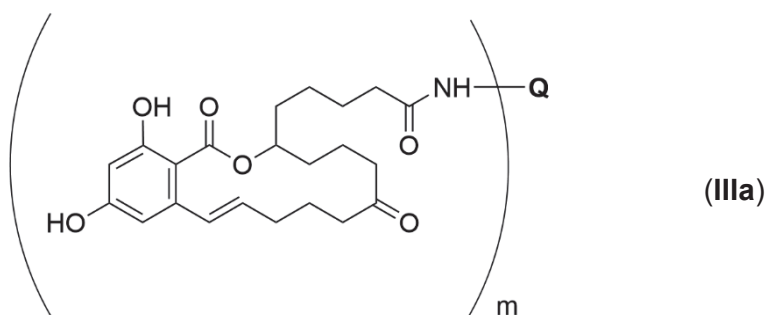


25 donde **T**, **L**, **Z** y **m** tienen el mismo significado definido anteriormente en una de las reivindicaciones 1 a 5 y **Q** es un marcador no isotópico detectable.

- 10.** Un compuesto según la reivindicación anterior, en el que **Q** está seleccionado entre una molécula química detectora, marcadora o trazadora no isotópica, preferentemente está seleccionado entre: una enzima, biotina, un compuesto luminiscente, un fluoróforo, preferentemente, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta, más
5 preferentemente **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina un éster de acridinio, nanopartículas cuánticas, y nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

11. Un compuesto según la reivindicación 9 ó 10, de fórmula (**IIIa**)

10



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

12. Un anticuerpo obtenido mediante la utilización de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

- 20 **13.** Un anticuerpo que reconoce el compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

14. El anticuerpo según la reivindicación 12 ó 13, donde el anticuerpo se selecciona entre monoclonal, policlonal y recombinante.

- 25 **15.** Uso de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la obtención de un anticuerpo.

16. Uso de un anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende poner en contacto una muestra que contiene zearalenona con dicho anticuerpo para el análisis *in vitro* de zearalenona.

17. Uso según la reivindicación 16 que comprende:

- a) poner en contacto una muestra con el anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14;
- 5 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).

18. Uso de un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) definido en una cualquiera de las
10 reivindicaciones 1 a 11 para el análisis *in vitro* de zearalenona.

19. Uso según la reivindicación 18 que comprende:

- a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-zearalenona y con el compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 11;
- 15 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; y
- c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).

20. Uso según la reivindicación 19, donde la determinación de la reacción
20 inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando como competidor un compuesto o derivado marcado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

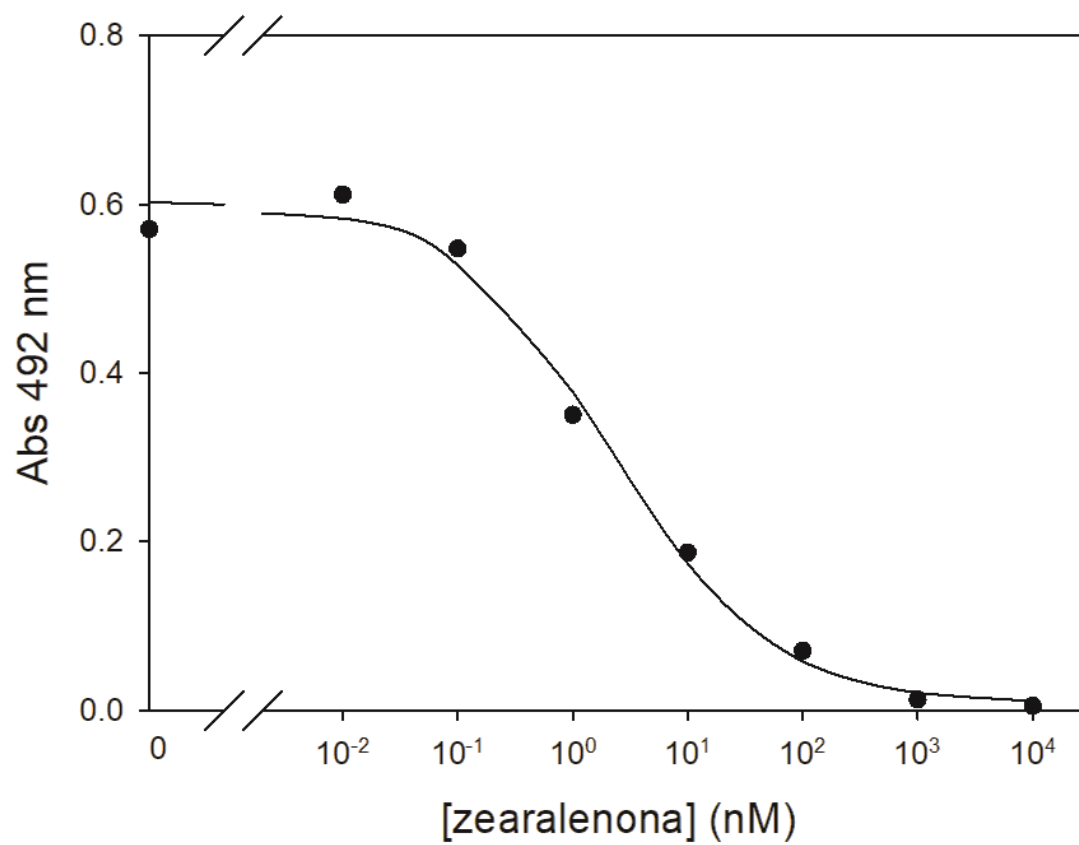
21. Uso del anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 para la purificación y/o concentración de zearalenona de una muestra.

25 **22.** Uso según la reivindicación 21 en el que la purificación y/o concentración se realiza mediante cromatografía de afinidad que comprende las siguientes etapas:

- 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 la zearalenona
30 presente en dicha muestra; y
- c) eluir la zearalenona retenida en el soporte.

23. Kit de detección y/o determinación de zearalenona 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.

FIGURA 1





- ②① N.º solicitud: 202330076
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.02.2023
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	ABAD-FUENTES, A. et al. Alternative Hapten Design for Zearalenone Immunoreagent Generation. Toxins, 02/03/2022, Vol. 14, Nº 185, <DOI: 10.3390/toxins14030185>. Ver resumen, secciones 2.4 y 2.5, conclusiones y figura 2.	1-23
A	WANG, Y. et al. Synthesis of Zearalenone Immunogen and Comparative Analysis of Antibody Characteristics, International journal of analytical chemistry, 26/07/2021, Vol. 2021, Nº 7109383, <DOI: 10.1155/2021/7109383 >. Ver resumen, secciones 2.4, 2.5, 2.7, 2.8, 2.9 y figuras 2-5.	1-23
A	LIU, M. T. et al. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. Applied and environmental microbiology, 08/1985, Vol. 50, Nº 2, Páginas 332-336, <DOI: 10.1128/aem.50.2.332-336.1985>. Ver resumen y sección Material y Métodos.	1-23
A	CN 114214288 A (JIANGSAN UNIV) 22/03/2022, párrafos 0006-0025 y 0033.	1-23

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
04.12.2023

Examinador
B. de Luis Fernández

Página
1/3



- ②① N.º solicitud: 202330076
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.02.2023
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
A	CN 102967709 A (BEIJING KWINBON BIOTECH CO LTD) 13/03/2013, párrafos 0005-0010, 0016-0020, 0029, 0058, 0070, 0086, 0107 y figura 2.	1-23
A	CN 108517013 A (CHINA NAT CENTER FOR FOOD SAFETY RISK ASSESSMENT et al.) 11/09/2018, párrafos 0001-0009, 0015-0022.	1-23
A	CHUN, H.,S. et al. A fluorescence polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn. Analytica Chimica Acta, 09/03/2009, Vol. 639, N° 1-2, Páginas 83-89 <DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.048>. Ver resumen, sección 2.3, 2.5, 2.6 y figura 1.	1-23

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
04.12.2023

Examinador
B. de Luis Fernández

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D313/00 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

G01N33/532 (2006.01)

C07K16/14 (2006.01)

B01D15/38 (2006.01)

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

C07D, G01N, C07K, B01D

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, CAPLUS, XPESP, REGISTRY