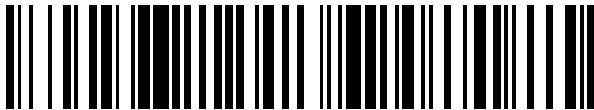


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 015 783**

(21) Número de solicitud: 202330902

(51) Int. Cl.:

C07D 311/76 (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:

03.11.2023

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

08.05.2025

(71) Solicitantes:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.00%)
Av. Blasco Ibáñez, 13
46010 VALENCIA (Valencia) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.00%)

(72) Inventor/es:

MERCADER BADIA, Josep Vicent;
ABAD FUENTES, Antonio;
ABAD SOMOVILLA, Antonio;
AGULLÓ BLANES, Consuelo;
NAVARRO FUERTES, Ismael y
ULLOA CAMPOS, Diego Alonso

(74) Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

(54) Título: **COMPUESTOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE CITRININA**

(57) Resumen:

Compuestos y anticuerpos para la inmunodetección de citrinina.

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

ES 3 015 783 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE CITRININA CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las biotoxinas son un tipo de contaminante cuya presencia en alimentos, aguas y piensos representa un verdadero problema para la salud humana y el bienestar animal, ocasionando importantes pérdidas económicas a los sectores agroalimentario, 20 agropecuario y piscícola. La clase de biotoxinas más frecuentemente detectadas en alimentos son las producidas por hongos, llamadas micotoxinas. Particularmente, citrinina es una micotoxina policétida producida por varias especies fúngicas de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus*. Este metabolito secundario se descubrió por primera vez en la década de 1930 en cultivos de *P. citrinum*. Pronto se descubrió 25 que el compuesto tenía potentes propiedades antibacterianas, aunque sus efectos tóxicos en mamíferos aconsejaron descartar su uso como antibiótico (Zhang et al., *Food Res. Int.* **2021**, 141, 110075). La citrinina es nefrotóxica y se considera un carcinógeno del grupo 3, aunque aún se desconoce el mecanismo de su toxicidad. Por lo general, 30 esta micotoxina se forma después de la cosecha y aparece principalmente en granos almacenados, pero también en otros productos vegetales como judías, frutas y verduras, hierbas y especias, y en productos lácteos en mal estado (European Food Safety Authority, *EFSA J.* **2012**, 10, 2605). La nefropatía endémica de los Balcanes, una

enfermedad renal que afecta a los habitantes de las zonas rurales del sureste de Europa, se ha asociado a la exposición crónica a bajas concentraciones de micotoxinas, incluida la citrinina, a través de la dieta. El "síndrome del arroz amarillo" en Japón también se ha relacionado con la citrinina debido a la presencia constante de *P. citrinum* en este producto alimenticio. Además, se ha informado de que los complementos alimenticios elaborados con arroz de levadura roja (arroz fermentado con *Monascus* spp.) contienen altos niveles de citrinina.

La Unión Europea ha reconocido el problema de la contaminación alimentaria por citrinina y ha fijado un nivel máximo de 100 µg/kg para la citrinina en los complementos alimenticios a base de arroz fermentado con la levadura roja *Monascus purpureus* (Commission Regulation (EU) 2019/1901, *Off. J. EU* **2019**, 293/2). Según el Grupo Europeo de Expertos sobre Contaminantes de la Cadena Alimentaria (Grupo CONTAM), las concentraciones de citrinina notificadas en cereales varían ampliamente, tanto cuando se destinan al consumo como alimento (hasta 420 µg/kg) como cuando se destinan al consumo como pienso (hasta 998 µg/kg) (European Food Safety Authority, *EFSA J.* **2012**, 10, 2605). Curiosamente, esta micotoxina se encuentra de forma concomitante con la ocratoxina A y la patulina en cereales y en manzanas y alimentos a base de manzana, respectivamente. Además, se ha detectado citrinina en muestras de orina humana a niveles que sugieren una exposición no despreciable (Narváez et al., *J. Agric. Food Chem.* **2021**, 69, 6330–6338) Según declaró la EFSA, se necesitan más datos sobre la presencia de citrinina en Europa, así como materiales de referencia certificados y criterios de rendimiento definidos para el análisis de citrinina en alimentos y piensos (European Food Safety Authority, *EFSA J.* **2012**, 10, 2605). La presencia mundial de citrinina en determinados alimentos a niveles elevados, combinada con sus efectos potencialmente adversos para la salud, está fomentando la aplicación de nuevas normativas para esta micotoxina menos estudiada (Silva et al., *Foods* **2021**, 10, 14).

Las técnicas analíticas para la determinación de citrinina en alimentos son fundamentalmente de dos tipos: cromatográficas y de reconocimiento molecular. Entre las primeras, la que goza de más aceptación actualmente es HPLC con detector de fluorescencia, 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 5 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 citrinina, debido a su bajo peso molecular, no es inmunogénica, y por 10 tanto es incapaz de generar una respuesta inmunitaria por sí misma cuando se inyecta en un animal de experimentación. Para poder generar anticuerpos para citrinina 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 15 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.

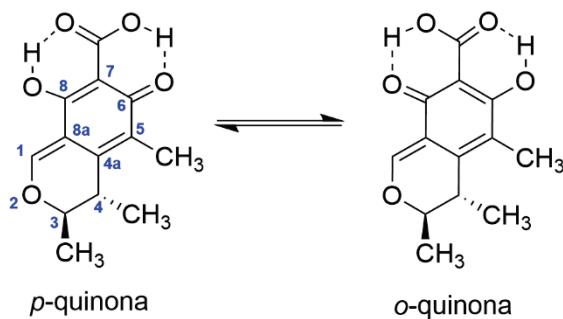
20 En el caso de citrinina, los enfoques descritos hasta ahora para la síntesis de haptenos han implicado principalmente la conjugación directa a través de los grupos hidroxilo o carboxilo de la molécula, mediante los métodos del carbonildiimidazol o del éster activo utilizando una carbodiimida y *N*-hidroxisuccinimida (Cheng et al., PLoS ONE 2015, 10(7): e0131482), reacción de Mannich, utilizando formaldehído (Abramson et al., *App. 25 Environ. Microbiol.* 1995, 61(5), 2007–2009; Wu et al., RSC Adv. 2022, 12, 19981), y, en algunos casos, 1,4-butanodiol diglicidil éter (Li et al., *J. Food Safety* 2011, 31, 497–504; Yirga et al., *Toxins* 2017, 9, 110). Por su naturaleza, estas estrategias de 30 funcionalización implican cambios relevantes en las propiedades estereoelectrónicas de la molécula original, particularmente de los grupos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno, que constituyen la región potencialmente más inmunogénica de la molécula.

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 sensibles y selectivos, 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 5 la determinación, detección, concentración o extracción de citrinina, preferentemente mediante la utilización de un kit que pueda ser utilizado por la industria alimentaria, agrícola, clínica y/o medioambiental. Asimismo, los conjugados novedosos, basados en haptenos funcionalizados a través de una posición de la molécula de citrinina nunca antes explorada, pueden, en combinación con anticuerpos pre-existentes o generados 10 a partir de aproximaciones convencionales, posibilitar el desarrollo de métodos inmunoanalíticos para la determinación de citrinina con prestaciones superiores a las actualmente disponibles.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención aporta una solución a los actuales métodos inmunoanalíticos para la determinación de citrinina al 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 citrinina con todos los grupos funcionales 20 característicos inalterados, 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 invención reside en el descubrimiento de la capacidad de los conjugados de la molécula de citrinina derivatizada a través del átomo de carbono del grupo metilo en C-5 del anillo de isocromeno (esquema 1) – incorporando a dicha posición un brazo espaciador 25 hidrocarbonado de longitud diversa – de inducir una respuesta inmunitaria muy eficaz que conduce a la generación de anticuerpos de muy elevada afinidad y especificidad hacia esta micotoxina, y por tanto adecuados para el desarrollo de procedimientos de inmunodetección de citrinina.



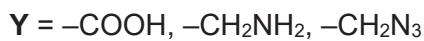
Esquema 1. Isómeros de citrinina.

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

En esta memoria se entiende por "análogo de citrinina" un hapteno, definido como



pudiendo ser el grupo funcional **Y** uno de los tres grupos funcionales que se indican a
10 continuación.



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:

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

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

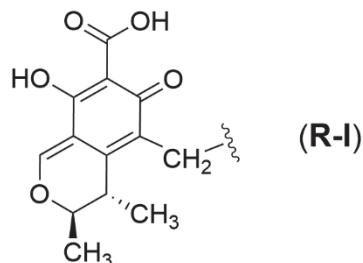
Y = $-\text{CH}_2\text{N}_3$ se transforma en **Z** =

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



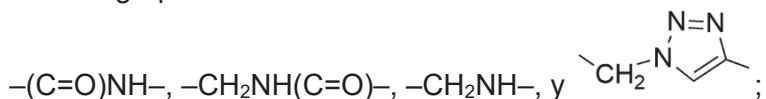
donde

T es **R-I**,



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

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



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

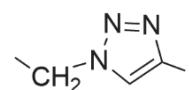
X está seleccionado entre **P** y **Q**, tal que

- 10 **P** es un péptido o polipéptido de naturaleza no enzimática, natural o sintético, de peso molecular igual o 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



- 15 Más preferentemente, **Z** es

No existe un límite superior para el peso molecular posible de **P**, solo inferior pues depende del sistema inmunitario. Por ejemplo, dicho límite inferior 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, como la celulosa y sus derivados, o sintético, como la nitrocelulosa o el poliestireno, 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 40, más preferiblemente **m** es un valor entre 1 y 20, y especialmente preferible entre 1 y 10.

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



donde

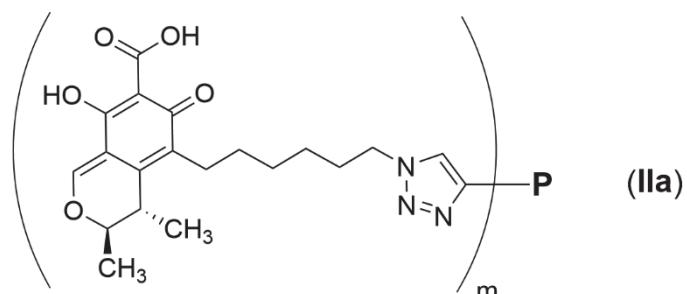
T, **L**, **Z** y **P** tienen los mismos significados dados anteriormente.

El valor de **m** indica el grado de conjugación, es decir, la relación molar entre la fracción 15 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 40, más preferiblemente entre 1 y 20, y especialmente preferible entre 1 y 10.

Según una realización preferida de la presente invención, el conjugado de fórmula (II) 20 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)

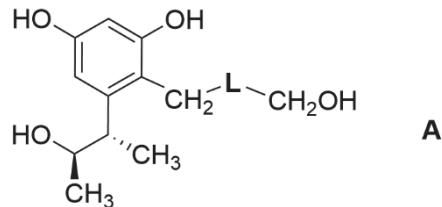


donde

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

- 5 El conjugado de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar el análogo funcionalizado de citrinina de fórmula **T-L-Y** (hapteno), donde **T** y **L** se han definido anteriormente e **Y** es un grupo funcional seleccionado entre $-COOH$, $-CH_2NH_2$, y $-CH_2N_3$, con **P**, un polipéptido natural o sintético de naturaleza no enzimática de peso molecular mayor de 2000 Dalton, por
10 métodos ampliamente conocidos en la técnica (*Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, UK, 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 de una ruta sintética que implica como intermedio clave común el compuesto **A**

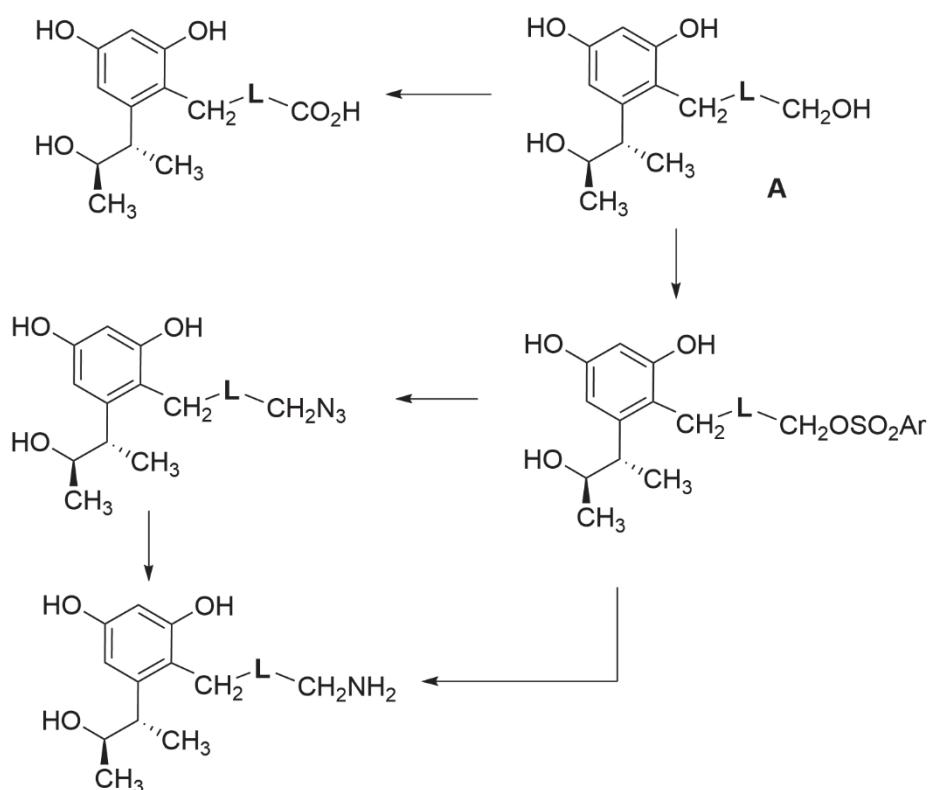


15

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

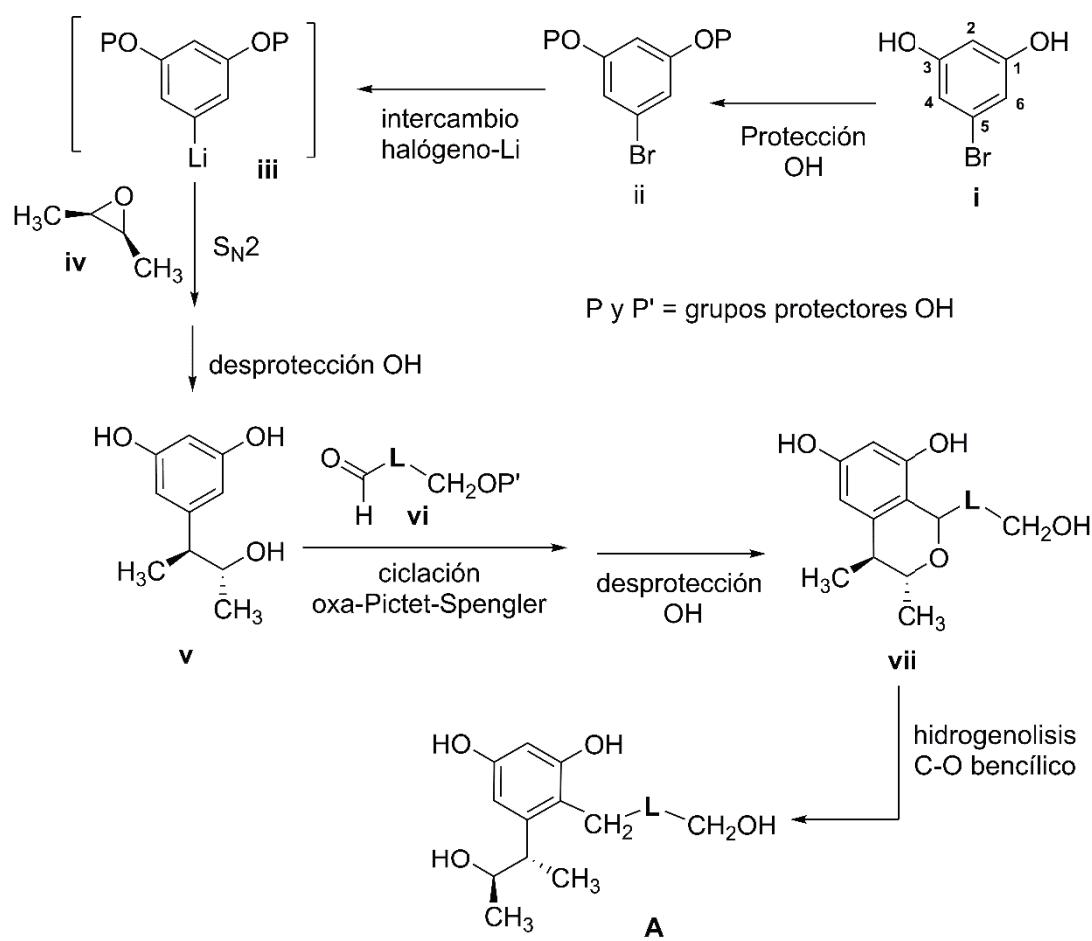
- A partir de este intermedio, el grupo terminal $-CH_2OH$ se puede transformar fácilmente por métodos ampliamente conocidos en la técnica sintética en cualquiera de los grupos funcionales definidos previamente como **Y**, un grupo funcional seleccionado entre $-COOH$, $-CH_2NH_2$, y $-CH_2N_3$. Por ejemplo, el grupo $-CH_2OH$ se puede oxidar directamente al grupo $-COOH$, con oxidantes como oxígeno y platino catalítico o transformarlo en un grupo $-CH_2N_3$ a través de la previa transformación quimioselectiva del grupo hidroxilo primario en un grupo aril-sulfonato ($-CH_2OSO_2Ar$) y posterior sustitución del grupo aril-sulfonato por un anión azida (N_3^-) mediante reacciones
20 convencionales de sustitución nucleofílica alifática. El grupo $-CH_2NH_2$ puede prepararse también a partir del grupo $-CH_2OH$ a través del mismo aril-sulfonato intermedio por sustitución nucleofílica del grupo aril-sulfonato con un nucleófilo nitrogenado, como NH_3 o un equivalente sintético del mismo, o incluso a partir del propio grupo $-CH_2N_3$ mediante
25

reacciones conocidas de reducción del grupo azida (N_3) a amino (NH_2), por ejemplo vía hidrogenación catalítica o por tratamiento con Ph_3P . Ejemplos de estas interconversiones de grupos funcionales, ilustradas en el siguiente esquema, se describen, por ejemplo, en *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1391–1396, para transformar 5 – CH_2OH en – CO_2H , *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10013–10021, para transformar – CH_2OH en – CH_2N_3 , *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1990**, (11), 3027–3033 para transformar – CH_2OH a través del aril-sulfonato intermedio en – CH_2NH_2 o *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12608–12609, para transformar – CH_2N_3 en – CH_2NH_2 .



Tal como se ilustra en el siguiente esquema, la síntesis del intermedio **A** puede efectuarse a partir del compuesto comercial 5-bromoresorcínol (**i**), mediante una serie de transformaciones sintéticas que se inician con la protección adecuada de los grupos hidroxílicos fenólicos en C–1 y C–3, para dar un intermedio tal como **ii**, seguido de la incorporación de la cadena de 3-hidroxi-2-butanilo en la posición C–5, vía una reacción de apertura nucleofílica del comercialmente disponible (*2R,3S*)-2,3-dimetiloxirano (**iv**) con el organolítico derivado del intermedio halogenado (**iii**). La incorporación de la cadena hidrocarbonada hidroxilada en C–6 (— $\text{CH}_2\text{—L—CH}_2\text{OH}$, donde **L** tiene el mismo significado dado anteriormente) se completa a partir del intermedio hidroxilado (**v**) mediante una reacción de ciclación de oxa-Pictet-Spengler entre un aldehído tal como **vi**, que incorpora la cadena **L** con la longitud requerida y la función hidroxílica terminal convenientemente protegida, por ejemplo, como éster bencílico (OCH_2Ph o

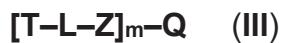
OBn). Los aldehídos como los requeridos para esta etapa son conocidos y están disponibles comercialmente (por ejemplo, para una longitud de **L** de entre 1 y 12 átomos de carbono y la función hidroxílica terminal protegida como éter bencílico). La síntesis de intermedio clave **A** se completa a partir del producto formado en la reacción de oxa-Pictet-Spengler mediante desprotección del grupo hidroxilo terminal, seguida de la fragmentación por hidrogenólisis del enlace C—O bencílico del sistema bicíclico resultante (**vii**).



El conjugado de fórmula (II) de la presente invención puede utilizarse para la producción
10 de anticuerpos, o como antígeno de ensayo junto con un anticuerpo de citrinina 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
15 citrinina **T-L-Y** definido anteriormente. Cuando el material portador es un marcador no

isotópico detectable, el derivado del análogo de citrinina es un compuesto de fórmula (III):



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

- 5 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 un 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 40, más preferiblemente entre 1 y 20, y especialmente preferible entre 1 y 10.

- 10 **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.

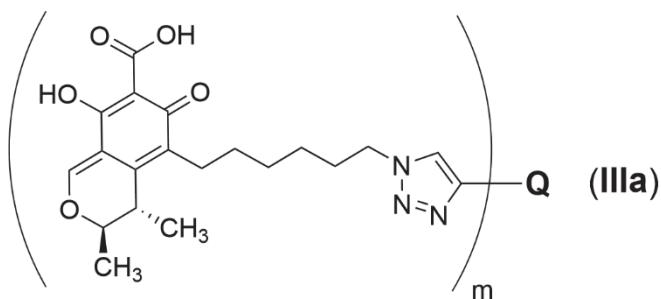
- En la presente invención se entiende por "marcador" cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica analítica. En la presente 15 invención, **Q** identifica un fragmento de una molécula, o una molécula química detectora, marcadora o trazadora no isotópica.

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

- Una enzima se entiende en la presente memoria como una proteína, péptido o 25 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)



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

- 5 El derivado marcado de fórmula (III) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un análogo funcionalizado de citrinina 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, Academic Press, London, UK, 2013).
- 10 Este compuesto de fórmula (III) puede utilizarse junto con un anticuerpo de citrinina 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”.

- 15 Para obtener anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia citrinina, así como para desarrollar inmunoensayos para analizar dicha micotoxina, se han preparado análogos funcionalizados de citrinina 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 citrinina por un espaciador **L**. La posición por la que se une el espaciador **L** a la estructura de citrinina 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 citrinina al sistema inmunitario. Determinar cuál es la mejor posición de la estructura de citrinina 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-5 del anillo
- 20
- 25

aromático de citrinina. 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 citrinina, e incluso la viabilidad de los conjugados de fórmula (II) o de los derivados marcados de fórmula (III) para actuar como moléculas competidoras

- 5 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).

- 10 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
15 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.

- 20 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 policloniales o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos de la invención tienen alta
25 afinidad y especificidad hacia citrinina.

En una realización particular, la afinidad (IC_{50}) hacia citrinina 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.

- 30 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 citrinina. En particular el

uso comprende poner en contacto una muestra que contiene citrinina con dicho anticuerpo; y más específicamente comprende:

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

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 citrinina mediante ELISA competitivo. En particular, este uso comprende:

- 10 **a)** poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-citrinina y con el compuesto de fórmula **(II)** o el derivado marcado de fórmula **(III)** definido anteriormente;
- 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)**.

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 citrinina mediante cromatografía de flujo lateral. Preferiblemente, este uso comprende las siguientes etapas:

- 20 **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
- 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 citrinina de una muestra. 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 citrinina presente en dicha muestra. La elución posterior de la citrinina 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 uso comprende realizar las siguientes etapas:

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

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

Un aspecto adicional de la presente invención también se refiere a un kit de detección de citrinina 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.

15 Los usos descritos en la presente invención permiten la determinación cuantitativa o análisis cualitativo del contenido de la micotoxina citrinina en una muestra. Asimismo, los usos descritos en la presente invención permiten analizar el contenido de citrinina en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de alimentos, como cereales, frutas y leche, muestras medioambientales tales como agua, suelo o superficie, y
20 muestras biológicas aisladas tales como orina. Preferentemente, la presente invención proporciona un método de análisis *in vitro* de citrinina en arroz y sus derivados fermentados.

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
25 inmunoensayos competitivos son aquéllos en los que el analito compite con otra molécula por la unión con el anticuerpo.

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

5 (III) que se utiliza en el ensayo competitivo.

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.

10 A continuación se ilustra con algunos ejemplos la forma en que puede efectuarse la preparación de análogos funcionalizados de citrinina 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
15 tener la naturaleza estructural del conjugado de fórmula (II) y (III) para la producción de anticuerpos de afinidad y especificidad adecuadas hacia citrinina, aptos para el desarrollo de un método inmunoanalítico eficaz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 **Fig. 1.** Curva estándar para citrinina en el formato de ELISA competitivo directo con trazador enzimático homólogo usando el anticuerpo monoclonal **Ila#411** producido a partir del conjugado BSA-Ila.

EJEMPLOS

25 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 citrinina 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.

1. Técnicas generales

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 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 fosfomolíbdico y calor como agentes de revelado. La cromatografía se refiere a la cromatografía en columna 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 de ^1H y ^{13}C se registraron a 25 °C, en el disolvente indicado, a 300/75 MHz (espectrómetro Bruker AvanceII 300), 400/101 (espectrómetro Bruker AV400) o 500/126 MHz (Bruker Avance DRX500). Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C (escala δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del tetrametilsilano y se refieren al protón o carbono residual en el disolvente de RMN (CHCl_3 : δ 7,26/77,16; CD_3OD : δ 3,31/49,00). Se utilizó una combinación de experimentos COSY, HSQC y HMBC editados para asignar los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}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). 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 .

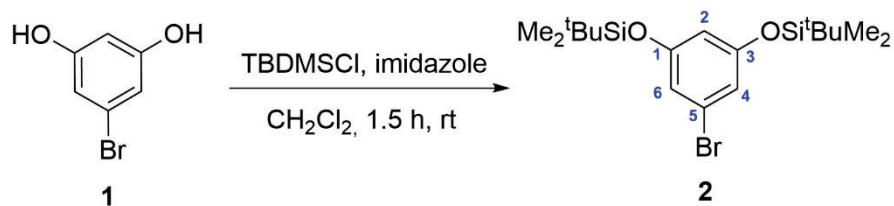
1.2. Reactivos, equipos y técnicas generales utilizadas en la generación de anticuerpos y el desarrollo de inmunoensayos

Citrinina y sus metabolitos de referencia se adquirieron de Fermentek (Jerusalén, Israel). La BSA (albúmina de suero bovino fracción V) fue de Roche Applied Science

(Mannheim, Alemania). Sigma/Aldrich (Madrid, España) proporcionó OVA (albúmina de huevo), HRP (peroxidasa de rábano picante), suero bovino y adyuvantes de Freund. La 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) utilizada fue de Acros Organics. 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 PB (tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,4) como tampón de elución. Como anticuerpo de captura se usó un anticuerpo políclonal 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.

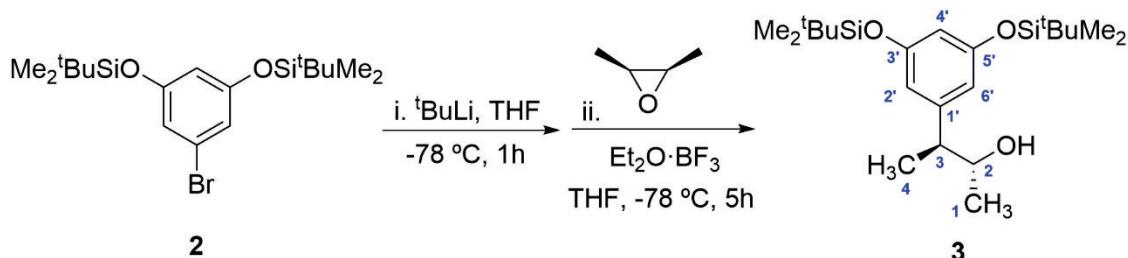
2. Preparación del hapteno de fórmula T–L–Y para T = R-I, L = –CH₂CH₂CH₂CH₂– y Y = –CH₂N₃ (Hapteno CT-1)

2.1. Preparación de ((5-bromo-1,3-fenileno)bis(oxi))bis(terc-butildimetilsilano) (2)



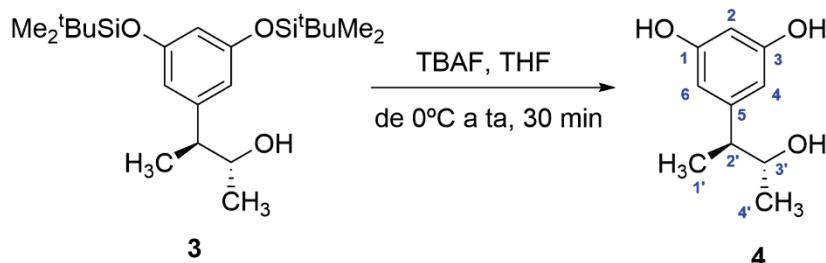
Una solución de 5-bromoresorcinol (**1**, 529 mg, 2,80 mmol), cloruro de *terc*-butildimetilsililo (TBDMSCl, 1,26 g, 8,39 mmol, 3,0 equivalentes) e imidazol (1,14 g, 16,8 mmol, 6,0 equivalentes) en CH₂Cl₂ anhidro (30 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h bajo nitrógeno. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo dos veces con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se cromatógrafió sobre gel de sílice, utilizando hexano como eluyente, para obtener el derivado disililado **2** (1,16 g, 99%) como un aceite incoloro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6,62 (d, *J* = 2,2 Hz, 2H, H-4, H-6), 6,25 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-2), 0,97 (s, 18H, 2xSiCMe₃), 0,19 (s, 12H, 2xSiMe₂). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 157,3 (C-1, C-3), 122,3 (C-5), 117,1 (C-4, C-6), 111,3 (C-2), 25,8 (2xSiCMe₃), 18,3 (2xSiCMe₃), -4,3 (2xMe₂Si). EMAR (TOF ESI+) calculado para C₁₈H₃₄BrO₂Si₂ [M+H]⁺ 417,1275, encontrado 417,1275.

2.2. Preparación de (2RS,3SR)-3-(3,5-bis((terc-butildimetilsilil)oxi)fenil)butan-2-ol (3)



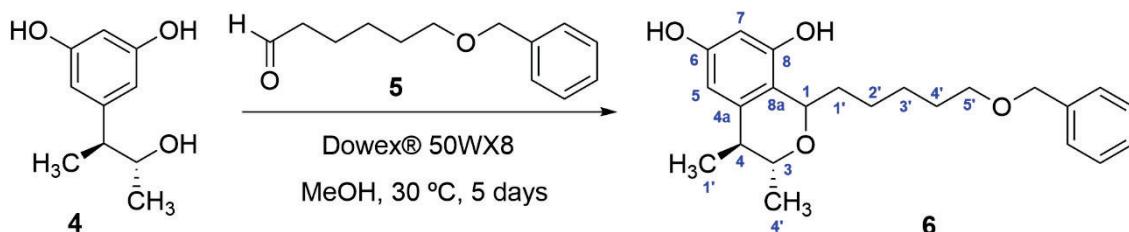
Una solución 1,7 M de *terc*-butillitio en pentano (3,4 mL, 5,75 mmol, 2,1 equivalentes) se añadió gota a gota durante 10 min a una solución agitada del bromuro de arilo **2** (1,14 g, 2,74 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (THF, 15 mL) a -78 °C bajo argón. La solución amarillenta resultante se agitó a la misma temperatura durante 1 h, luego se añadió (2*R*,3*S*)-2,3-dimetiloxirano (251 µL, 2,86 mmol, 1,05 equivalentes) seguido de la adición inmediata de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (355 µL, 2,86 mmol, 1,05 equivalentes). La solución incolora resultante se agitó durante 5 h a -78 °C, se diluyó con Et_2O y se lavó sucesivamente con una solución acuosa saturada de NH_4Cl , agua y salmuera, se secó sobre MgSO_4 anhidro y se concentró al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna, utilizando mezclas de hexano- Et_2O (9:1) y hexano-AcOEt (95:5) como eluyente, para dar el alcohol **3** (813 mg, 72%) como un sólido blanco. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6,35 (dd, J = 2,2, 0,4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6,23 (t, J = 2,2 Hz, 1H, H-4'), 3,82–3,70 (m, 1H, H-2), 2,53 (p, J = 7,1 Hz, 1H, H-3), 1,22 (d, J = 1,0 Hz, 3H, H-1), 1,19 (d, J = 2,1 Hz, 3H, H-4), 0,97 (s, 18H, 2xSiCMe₃), 0,19 (s, 13H, 2xSiMe₂). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 156,8 (C-3', C-5'), 145,7 (C-1'), 113,3 (C-2', C-6'), 110,7 (C-4'), 72,5 (C-2), 48,1 (C-3), 25,8 (2xSiCMe₃), 20,6 (C-1), 18,4 (2xSiCMe₃), 17,8 (C-4), -4,22 (2xSiMe₂). EMAR (TOF ESI+) calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}_3\text{Si}_2$ [M+H]⁺ 411,2745, encontrado 411,2743.

2.3. Preparación de 5-((2SR,3RS)-3-hidroxibutan-2-il)benceno-1,3-diol (**4**)



Una solución 1 M de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF (560 µL, 0,557 mmol, 2,1 equivalentes) se añadió gota a gota a una solución del fenol silitado **3** (109 mg, 0,265 mmol) en THF anhidro (1,5 mL) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla de reacción incolora se agitó durante 15 min a esta temperatura y luego durante 15 min adicionales a 5 temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en la mínima cantidad de CHCl₃ y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando como eluyente mezclas de CHCl₃ y MeOH (de 95:5 a 9:1), para dar el difenol **4** (47,5 mg, 98%) como un aceite incoloro. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 6,20 (dd, *J* = 2,2, 0,4 Hz, 2H, H-4, H-6), 6,11 (t, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-2), 3,83 (p, *J* = 6,3 Hz, 1H, H-3'), 2,58 (p, *J* = 7,1 Hz, 1H, H-2'), 1,18 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H, H-1'), 1,10 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H, H-4'). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 159,2 (C-1, C-3), 147,9 (C-5), 107,7 (C-4, C-6), 101,5 (C-2), 72,8 (C-3'), 48,4 (C-2'), 20,1 (C-4'), 16,9 (C-1'). EMAR (TOF ESI+) calculado para C₁₀H₁₅O₃ [M+H]⁺ 183,1016, encontrado 183,1014.

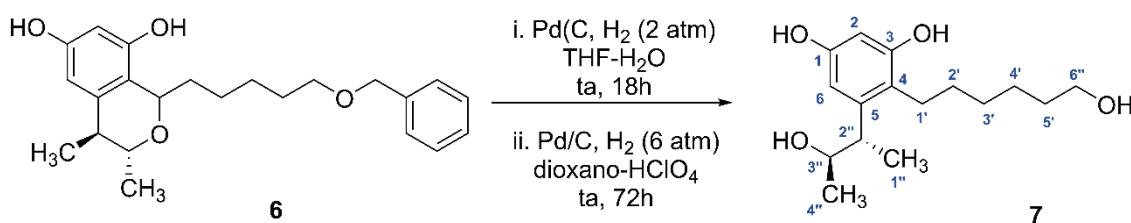
15 2.4. Preparación de (3RS,4SR)-1-(5-(benciloxi)pentil)-3,4-dimetilisocromano-6,8-diol (**6**)



Una solución del aldehído **5** (165,0 mg, 0,80 mmol, 1,1 equiv) en MeOH anhidro (0,8 ml) se añadió a una suspensión del difenol **4** (132,4 mg, 0,73 mmol) y Dowex® 50WX8 (170 mg) en MeOH seco (1 mL) a temperatura ambiente bajo N₂. La mezcla de reacción se 20 agitó durante 5 días a 30 °C, luego se filtró a través de una pequeña capa de Celite para eliminar la resina y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se cromatógrafió sobre gel de sílice utilizando CHCl₃-MeOH (98:2, 95:5 y 9:1) como eluyente, para dar el isocromano **6** (229,0 mg, 85%) como un aceite amarillo (una mezcla 3:2 de epímeros en C-1). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm, solo se dan las señales correspondientes al epímero mayoritario) 7,38–7,27 (m, 5H, Ph Bn), 6,35 (dd, *J* = 2,4, 1,1 Hz, 1H, H-5), 6,03 (dd, *J* = 2,4, 0,7 Hz, 1H, H-7), 5,24 (br s, 2H, 2x OH), 4,93 (ddd, *J* = 6,5, 2,9, 1,4 Hz, 1H, H-1), 4,49 (s, 2H, CH₂ Bn), 3,44 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, H-5'), 3,27 (dq, *J* = 9,3, 6,1 Hz, 1H, H-3), 2,52 (p, *J* = 7,1 Hz, 1H, H-4), 1,97 (dddd, *J* = 13,6, 10,5, 5,3, 3,0 Hz, 1H, Ha-1'), 1,87 (dddd, *J* = 13,7, 10,7, 6,4, 4,7 Hz, 1H, Hb-1'), 1,67–

1,51 (m, 2H, H-4'), 1,44–1,21 (m, 4H, H-2', H-3'), 1,31 (d, J = 6,1 Hz, 3H, Me-3), 1,13 (d, J = 6,9 Hz, 3H, Me-4). ^{13}C RMN (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 154,7 (C-6), 152,7 (C-8), 143,4 (C-4a), 138,5 (C-2 Bn), 128,5 (C-4/C-6 Bn), 127,9 (C-3/C-7 Bn), 127,7 (C-5 Bn), 117,4 (C-8a), 105,0 (C-5), 100,8 (C-7), 74,7 (C-3), 73,8 (C-1), 72,9 (CH_2 Bn), 70,8 (C-5'), 38,9 (C-4), 34,9 (C-1'), 29,5 (C-4'), 26,2 (C-2'), 24,5 (C-3'), 20,1 (Me-3), 15,5 (Me-4).
5 EMAR (TOF ESI+) calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_4$ [M+H] $^+$ 371.2217, encontrado 371.2205.

2.5. Preparación de 5-((2SR,3RS)-3-hidroxibutan-2-il)-4-(6-hidroxihexil)benceno-1,3-diol (7)

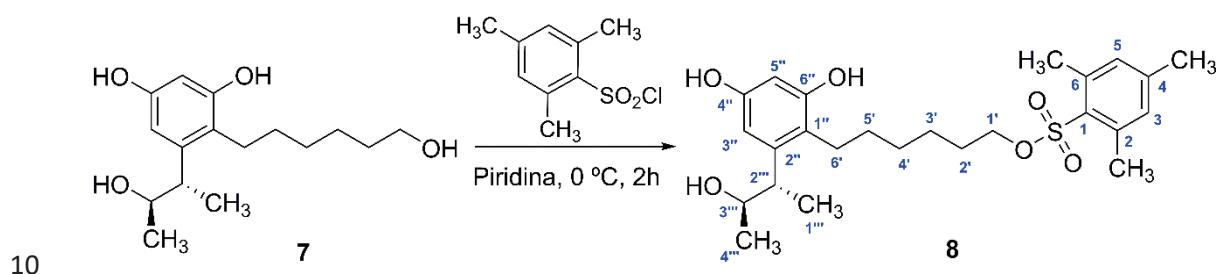


10 Una mezcla 98:2 de THF y H_2O (2 mL) se añadió a una mezcla del isocromano **6** (99,3 mg, 0,27 mmol) y 10% Pd/C (14,3 mg, 0,013 mmol, 0,05 equiv) contenida en un reactor Büchi tinyclave equipado con una barra de agitación magnética. La suspensión se sometió a ciclos de purga con hidrógeno, luego la presión se ajustó a 2 atm y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la reacción 15 se filtró a través de una pequeña capa de celite y el disolvente se evaporó al vacío para obtener un aceite incoloro (77,6 mg).

El material crudo obtenido anteriormente se transfirió nuevamente al reactor Büchi tinyclave, y se le añadió 10% Pd/C (44 mg, 0,041 mmol, 0,15 equiv) y una mezcla 95:5 de dioxano y ácido perclórico acuoso al 70% (3,5 mL). El reactor se purgó 20 exhaustivamente con hidrógeno, la presión de hidrógeno se ajustó a 6 atm y la mezcla de reacción se agitó 72 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a través de una pequeña capa de celite usando MeOH para lavar, el filtrado y el lavado se mezclaron y se trataron con una solución acuosa al 5% de NaHCO_3 hasta pH 8. La mayor parte del solvente orgánico se evaporó a presión reducida y la fase acuosa 25 resultante se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera y se secaron sobre MgSO_4 anhidro. El residuo que quedó tras la evaporación del disolvente se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, usando $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ 9:1 como eluyente, para dar el compuesto **7** (51,5 mg, 68%) como un aceite incoloro. ^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 6,27 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-6), 6,15 (d, J = 2,4 Hz, 1H,

H-2), 3,84 (p, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-3''), 3,55 (t, $J = 6,7$, 2H, H-6''), 3,02 (p, $J = 7,0$, 1H, H-2''), 2,66–2,61 (m , 1H, Ha-1'), 2,57–2,51 (m, 1H, Hb-1'), 1,60–1,36 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 1,16 (d, $J = 2,5$ Hz, 3H, H-4''), 1,14 (d, $J = 3,3$ Hz, 3H, H-1''). ^{13}C RMN (126 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 157,1 (C-1), 156,5 (C-3), 145,5 (C-5), 120,8 (C-4), 105,8 (C-6), 101,3 (C -2), 72,7 (C-3''), 63,1 (C-6'), 42,8 (C-2''), 33,7 (C-5'), 31,7 (C-2'), 30,8 (C- 3'), 26,9 (C- 1'), 26,1 (C-4'), 19,9 (C-4''), 17,5 (C-1''). EMAR (TOF ESI+) calculado para C₁₆H₂₇O₄ [M+H]⁺ 283,1904, encontrado 283,1904.

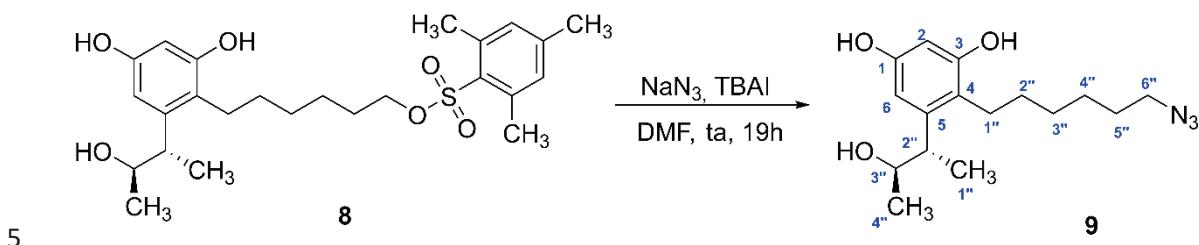
2.6. Preparación de 2,4,6-trimetilbencenosulfonato de 6-(2,4-dihidroxi-6-((2SR,3RS)-3-hidroxibutan-2-il)fenil)hexilo (8)



Una solución de alcohol **7** (42,6 mg, 0,15 mmol) y cloruro de mesitileno-2-sulfonilo (99,0 mg, 0,45 mmol, 3 equiv) en piridina anhidra (291 μL , 3,63 mmol, 24 equiv) se agitó a 0 °C bajo nitrógeno durante 2 h, luego se diluyó con agua, se enfrió en un baño de agua con hielo y se acidificó con HCl acuoso 1 M hasta pH 3-4. La mezcla se extrajo con AcOEt y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ acuoso al 5%, agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida sin alcanzar la sequedad. El residuo obtenido se transfirió a la cabeza de una columna cromatográfica de gel de sílice y se eluyó usando mezclas de CHCl₃ y MeOH (95:5 y 9:1) para dar el mesitilenosulfonato **8** (50,7 mg, 93%) como un aceite incoloro y 11,1 mg de material de partida sin reaccionar. ^1H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 7,07 (d, $J = 0,7$ Hz, 2H, H-3, H-5), 6,26 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-5''), 6,15 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3''), 3,96 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, H-1'), 3,83 (p, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-3''), 2,97 (p, $J = 7,0$ Hz, 1H, H-2''), 2,60 (s, 6H, Me-2, Me-6), 2,59–2,54 (m, 1H, Ha-6'), 2,52–2,46 (m, 1H, Hb-6'), 2,31 (s, 3H, Me-4), 1,66–1,60 (m, 2H, H-2'), 1,46–1,22 (m, 6H, H -3', H-4', H-5'), 1,15 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H, H-4''), 1,13 (d, $J = 7,6$ Hz, 3H, H-1''). ^{13}C RMN (126 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 155,7 (C-4''), 155,2 (C-2''), 144,2 (C-6''), 143,5 (C-1), 139,6 (C- 2, C-6), 131,4 C-3, C-5), 130,6 (C-4), 119,2 (C-1''), 104,4 (C-5''), 99,9 (C-3''), 71,3 (C-3''), 69,8 (C-1'), 41,4 (C-2''), 30,0 (C-2'), 28,6 (C-5'), 28,4 (C-4''), 25,1 (C-6'), 24,5 (C-3'), 21,4 (Me-2, Me-6), 19,6 (C-4''), 18,6 (Me-4), 16,3

(C-1''). EMAR (TOF ESI+) calculado para C₂₅H₃₇O₆S [M+H]⁺ 465,2306, encontrado 435,2306.

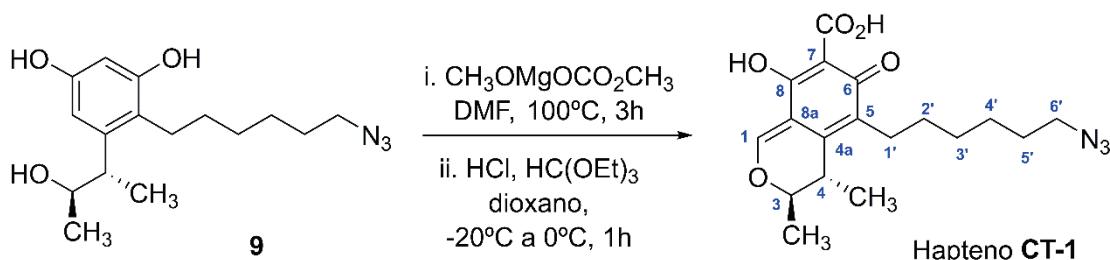
2.7. Preparación de 4-(6-azidohexil)-5-((2SR,3RS)-3-hidroxibutan-2-il)benceno-1,3-diol (9)



5

Una mezcla del sulfonato **8** (93,6 mg, 0,20 mmol), NaN₃ (52,4 mg, 0,81 mmol, 4 equiv) y yoduro de tetrabutilamonio (TBAI, 7,4 mg, 0,020 mmol, 0,1 equiv) en DMF anhidra (500 μL) se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante toda la noche. La suspensión blanca resultante se diluyó con agua y se extrajo con CHCl₃. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una solución acuosa al 5% de LiCl, agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhídrico y se concentraron al vacío. El residuo resultante se cromatógrafió sobre gel de sílice, usando CHCl₃ y CHCl₃-MeOH (98:2) como eluyente, para dar la azida **9** (56,0 mg, 91%) como un sólido blanco. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 6,27 (d, J = 2,5 Hz, 1H, H-6), 6,15 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-2), 3,84 (p, J = 6,3 Hz, 1H, H-3'), 3,27 (t, J = 6,9, 2H, H-6''), 3,01 (p, J = 7,1, 1H, H-2'), 2,66–2,59 (m, 1H, H-a-1''), 2,58–2,51 (m, 1H, Hb-1''), 1,65–1,56 (m, 2H, H-2''), 1,52–1,38 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-5''), 1,16 (d, J = 2,5 Hz, 3H, H-4'), 1,15 (d, J = 3,3 Hz, 3H, H-1'). ¹³C RMN (126 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 157,1 (C-1), 156,5 (C-3), 145,6 (C-5), 120,7 (C-4), 105,8 (C-6), 101,3 (C-2), 72,7 (C-3'), 52,5 (C-6''), 42,8 (C-2'), 31,5 (C-2''), 30,4 (C-5''), 29,9 (C-3''), 27,7 (C-4''), 25,9 (C-1''), 19,9 (C-4'), 17,6 (C-1'). EMAR (TOF ESI+) calculado para C₁₆H₂₆O₃N₃ [M+H]⁺ 308,1969, encontrado 308,1977.

2.8. Preparación del ácido (3RS,4SR)-5-(6-azidohexil)-8-hidroxi-3,4-dimetil-6-oxo-4,6-dihidro-3H-isocromeno-7-carboxílico (Hapteno CT-1)

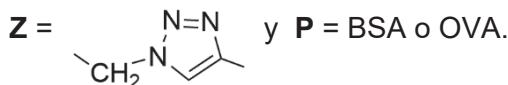


Una solución 2 M del reactivo de Stile (metilcarbonato de metoximagnesio, 430 µL, 0,86 mmol, 9 equiv) se añadió a la azida **9** (29,5 mg, 0,096 mmol) bajo argón y la solución resultante se calentó a 100 °C con agitación durante 3 h. Transcurrido este tiempo, la solución marrón resultante se enfrió a 0–5 °C, se diluyó con agua, se trató gota a gota 5 con una solución acuosa 5 M de H₂SO₄ (350 µL) y se extrajo cuatro veces con AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener un aceite parduzco (44,5 mg).

Una mezcla de una solución 4 M de HCl en dioxano (50 µL) y ortoformiato de trietilo 10 (500 µL), previamente preparada a –20 °C bajo argón, se transfirió rápidamente mediante una cánula de teflón sobre el producto obtenido anteriormente enfriado a la misma temperatura bajo argón. La solución de color amarillo anaranjado intenso resultante se agitó durante 1 h a 0 °C, posteriormente se diluyó con agua y se extrajo cuatro veces con AcOEt. Las capas orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente 15 con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, una solución acuosa 5 M de H₂SO₄, agua y salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó al vacío para dar el hapteno **CT-1** (31,1 mg, 90%) como un aceite de color amarillo intenso. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 15,9 (bs, 1H, CO₂H), 15,1 (bs, 1H, OH), 8,23 (s, 1H, H-1), 4,87–4,64 (m, 1H, H-3), 3,26 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H-6'), 2,95 (q, J = 7,1 Hz, 1H, H-4), 2,62–2,51 (m, 1H, Ha-1'), 2,36–2,25 (m, 1H, Hb-1'), 1,59–1,37 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 1,33 (d, J = 6,7 Hz, 3H, Me-3), 1,24 (d, J = 7,2 Hz, 3H, Me-4). ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 183,7 (C-6), 177,4 (C-8), 174,7 (CO₂H), 163,1 (C-1), 139,3 (C-4a), 127,7 (C-5'), 107,4 (C-8a), 100,6 (C-7), 81,9 (C-3), 51,5 (C-6'), 34,5 (C-4), 30,0 (C-3'), 29,5 (C-2'), 28,9 (C-5'), 26,6 (C-4'), 24,3 (C-1'), 19,6 (Me-3), 18,2 (Me-4). EMAR (TOF ESI+) 20 calculado para C₁₈H₂₄N₃O₅ [M+H]⁺ 362,1710, encontrado 362,1717.

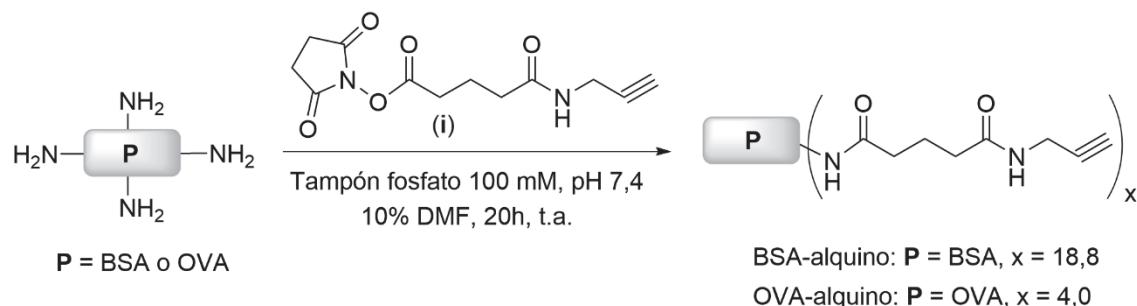
3. Preparación de conjugados proteicos de fórmula (II) del hapteno CT-1

Ejemplo: Preparación de conjugados de fórmula (II) para T = R-I, L = –CH₂CH₂CH₂CH₂–



3.1. Funcionalización de los grupos amino libres de proteínas con grupos alquinilo.

[Preparación de conjugados BSA-alquino y OVA-alquino]



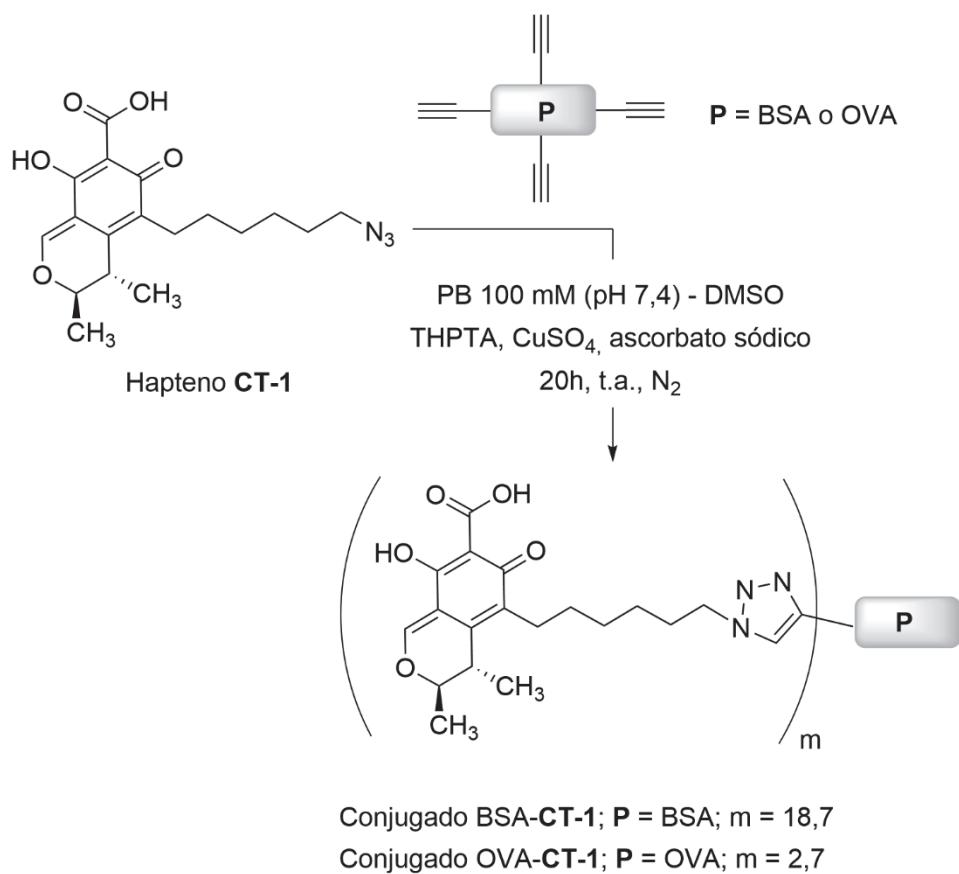
El éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del ácido 5-oxo-5-(prop-2-en-1-ilamino)pentanoico (**i**),
 5 se disolvió en DMF y se añadió gota a gota sobre una disolución de cada proteína (BSA u OVA) en PB. Las relaciones molares de alquino a proteína (RM_0) empleadas en la mezcla de reacción fueron 25 y 10 para la derivatización de BSA y OVA, respectivamente (ver Tabla 1, entradas 1 y 2). La reacción de conjugación se realizó con un contenido máximo de DMF del 10% (v/v). Después de la incubación durante la
 10 noche a temperatura ambiente, las proteínas alquiniladas se purificaron por cromatografía de exclusión molecular usando una columna de desalinización Sephadex G-25 HiTrap® de 5 mL y PB como eluyente, a un flujo de 5 mL/min y recogiendo fracciones de 1 mL, y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. El número medio de residuos de alquino incorporados por molécula de proteína/enzima (relación molar
 15 hapteno:proteína, RM) se calculó mediante MALDI-TOF-MS. Las RM obtenidas para BSA-alquino y OVA-alquino fueron 18,8 y 4,0, respectivamente (ver Tabla 2, entradas 1 y 2).

Tabla 1. Condiciones para la preparación de las proteínas/enzimas modificadas con grupos alquino

Proteína/Enzima				(alquino)-NHS éster			
	V (μ L) ^a	C (mg/mL) ^b	n (μ mol) ^c	V (μ L) ^d	C (mM) ^e	n (μ mol) ^f	Equivalentes ^g
1 BSA-alquino	2500	16	0,61	100	150	15	25
2 OVA-alquino	1900	15	0,64	43	150	6,5	10
3 HRP-alquino	900	6	0,14	140	10	1,4	10

^a Volumen utilizado de disolución de proteína o enzima en PB. ^b Concentración de la proteína o enzima en el PB. ^c μ mol de proteína o enzima utilizados. ^d Volumen utilizado de disolución del (alquino)-NHS éster en DMF. ^e μ mol del (alquino)-NHS éster utilizados. ^g Equivalentes de (alquino)-NHS éster utilizados por equivalente de proteína (RM_0).

3.2. Conjugación del hapteno CT-1 a proteínas modificadas con grupos alquinilo



3.2.1. Preparación del conjugado del hapteno **CT-1** con BSA [Conjugado BSA–**CT-1**]

Una disolución del hapteno **CT-1** en dimetilsulfóxido (DMSO, 780 µL, 5,7 mg, 15,6 µmol, 4 equivalentes de hapteno por residuo de alquino) se añadieron gota a gota sobre una disolución del conjugado BSA-alquino descrita en el apartado 3.1 (RM = 18,8, 15 mg, 0,22 µmol) PB (31 mL), con agitación a temperatura ambiente. Sobre la disolución resultante se añadieron, gota a gota, 112 µL de una disolución de *tris*(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 120 mM, 7,8 µmol, 2 equivalentes por residuo de alquino) y de CuSO₄ (40 mM, 1,4 µmol, 0,4 equivalente por residuo de alquino) en MiliQ H₂O. La mezcla resultante se desgasificó mediante ciclos vacío/nitrógeno y se añadieron 340 µL de una disolución 250 mM de ascorbato sódico en MiliQ H₂O (20 equivalentes por grupo de alquino), también desgasificada previamente mediante ciclos vacío/nitrógeno. La disolución resultante se agitó durante 21 h a temperatura ambiente, y el conjugado BSA–**CT-1** formado se separó del resto de reactivos usando filtros Amicon® Ultra-4 10K. Se llevaron a cabo tres ciclos de 5 min a 4800 rpm, usando PB, obteniéndose un volumen final de 2 mL. El bioconjugado BSA–**CT-1** se purificó por cromatografía de exclusión molecular en 3 columnas de desalinización Sephadex G-25 HiTrap™ de 5 mL acopladas, utilizando como tampón de elución PB. Tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que contenían el bioconjugado de BSA se reunieron, se esterilizaron por filtración a través de un filtro de nylon de 0,45 µm y se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL con tampón de elución filtrado y se almacenaron a –20 °C. El número medio de moléculas de hapteno **CT-1** conjugadas por cada molécula de BSA-alquino, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de m = 18,7 (ver Tabla 2, entrada 4).

3.2.2. Preparación del conjugado del hapteno **CT-1** con OVA [Conjugado OVA–**CT-1**]

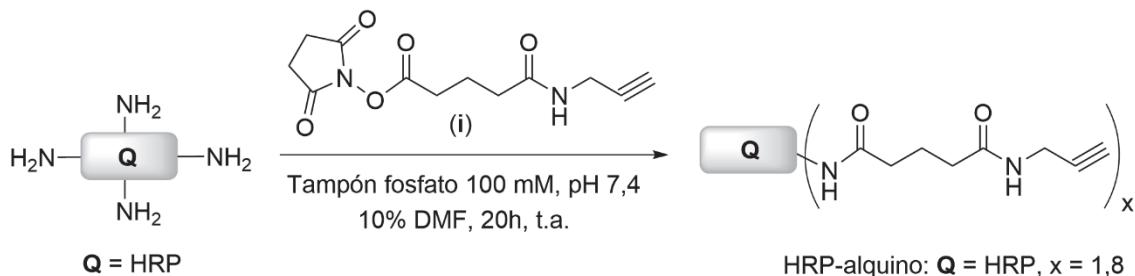
El conjugado OVA–**CT-1** se preparó como se ha descrito en el apartado 3.2. para el conjugado análogo de BSA, utilizando disoluciones de OVA-alquino (RM = 4,0) en PB (5,7 mg/mL, 2,63 mL, 0,34 µmol), hapteno **CT-1** en DMSO (20 mM, 272 µL, 5,44 µmol, 4 equivalente por grupo de alquino), THPTA (120 mM, 2,72 µmol)/CuSO₄ (40 mM, 0,54 µmol) en MiliQ H₂O (36,3 µL) y ascorbato sódico en MiliQ H₂O (250 mM, 109 µL, 27,2 µmol). El conjugado obtenido tras la purificación se llevó a una concentración final de 3 mg/mL en PB y se almacenó a –20 °C. El número medio de moléculas de hapteno **CT-1** conjugadas por cada molécula de OVA-alquino, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de m = 2,1 (ver Tabla 2, entrada 5).

4. Preparación de conjugados enzimáticos de fórmula (III) del hapteno CT-1

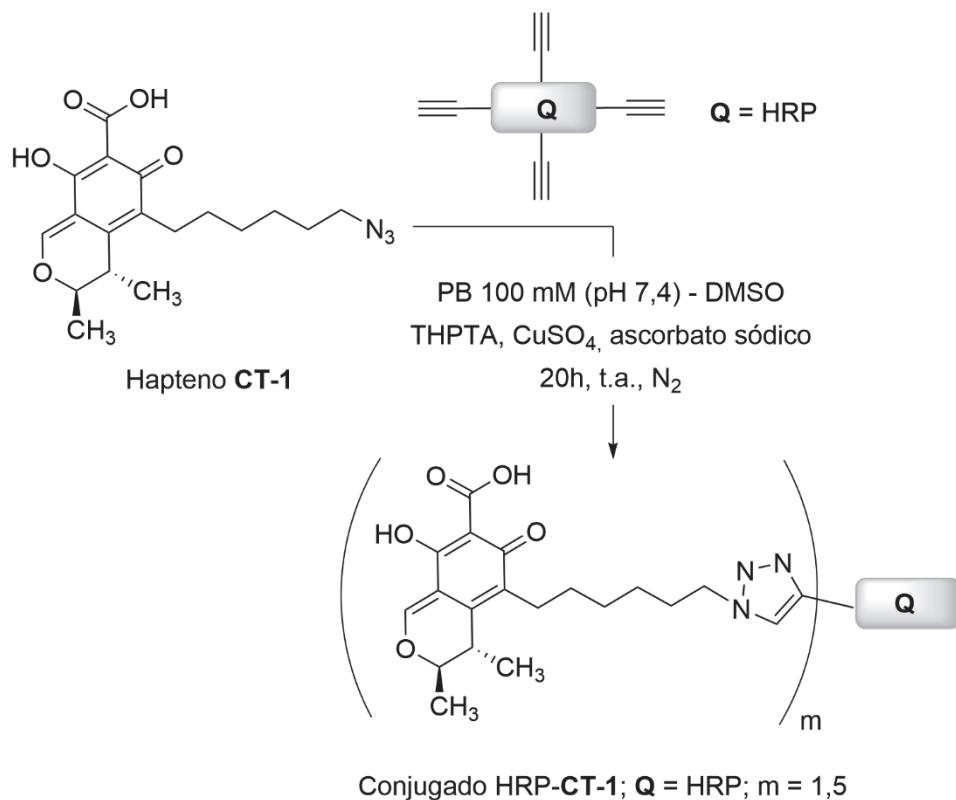
Ejemplo: Preparación de conjugados de fórmula (III) para $T = R-I$, $L = -CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $Z = \begin{array}{c} N=N \\ | \\ -CH_2-N \\ | \\ \backslash \\ C=C \end{array}$ y $Q = HRP$.

4.1. Funcionalización de los grupos amino libres de la enzima HRP con grupos alquinilo.

- 5 [Preparación del conjugado HRP-alquino]



Los grupos amino libres de la enzima HRP se derivatizaron con grupos alquinilo siguiendo el mismo protocolo descrito previamente para la derivatización análoga de los grupos amino de las proteínas BSA y OVA, tal como se ha detallado en el apartado 3.1, 10 utilizando en este caso una relación molar del éster activo alquinilado (**i**) a proteína (RM_0) de 10 (ver Tabla 1, entrada 3). Después de la incubación durante la noche a temperatura ambiente, la enzima alquinilada se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando una columna de desalinización Sephadex G-25 HiTrap[©] de 5 mL y PB como eluyente, a un flujo de 5 mL/min y recogiendo fracciones de 1 mL, y se almacenaron a 15 4 °C hasta su uso. El número medio de residuos de alquino incorporados por molécula de enzima (relación molar hapteno:enzima, RM) se calculó mediante MALDI-TOF-MS. La RM obtenida para el conjugado HRP-alquino fue 1,8 (ver Tabla 2, entrada 3).

4.2. Preparación del conjugado del hapteno **CT-1** con HRP [Conjugado HRP-**CT-1**]

El conjugado HRP-**CT-1** se preparó como se ha descrito en el apartado 3.2 para el conjugado análogo de BSA, utilizando disoluciones de HRP-alquino (RM = 1,8) en PB (1 mg/mL, 3 mL, 68 nmol), hapteno **CT-1** en DMSO (20 mM, 13,5 µL, 270 nmol, 4 equivalente por grupo de alquino), THPTA (120 mM, 136 nmol)/CuSO₄ (40 mM, 27 nmol) en MiliQ H₂O (1,7 µL) y ascorbato sódico en MiliQ H₂O (250 mM, 5,2 µL, 1360 nmol). El conjugado obtenido tras la purificación se llevó a concentraciones conocidas de entre 250–650 µg/mL en PB con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenó a 4 °C. El número medio de moléculas de hapteno **CT-1** conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de m = 1,5 (ver Tabla 2, entrada 6).

TABLA 2. Valores de la carga hapténica de los conjugados proteicos y enzimáticos del hapteno **CT-1** determinados por MALDI-TOF-MS.

	Conjugado	RM₀	equiv	m/z	Δ(m/z)	Δm/hapteno	x/m
1	BSA-alquino	25	-	69.414	2.833	151	18,8
2	OVA-alquino	10	-	45.035	603	151	4,0
3	HRP-alquino	10	-	43.450	268	151	1,8
4	BSA-CT-1	72	4	76.162	6.748	361	18,7
5	OVA-CT-1	16	4	45.781	746	361	2,1
6	HRP-CT-1	7,2	4	43.980	530	361	1,5

RM₀: Equivalentes de alquino o hapteno por molécula de proteína o marcador enzimático utilizados para la conjugación.

equiv: equivalente de hapteno por cada grupo de alquino en la proteína o marcador enzimático.

Δ(m/z): (m/z conjugado) – (m/z proteína o enzima de referencia).

Δm/hapteno: incremento de masa por cada molécula de hapteno conjugada.

x: número medio de moléculas de alquino conjugadas por molécula de proteína o marcador enzimático; **m:** Número medio de moléculas de hapteno conjugadas por molécula de proteína o marcador enzimático.

5. 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 citrinina 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 (GAM) a 1 µg/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 monoclonal a diferentes

15 concentraciones en PBST (tampón 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 (tampón 10 mM fosfato, pH 7,4, con 140 mM NaCl) seguido de 50 µL por pocillo de trazador enzimático en PBST, que es un derivado de fórmula (IIIa) donde **Q** es HRP, a diversas 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 µL por pocillo de una disolución 1 mM de TMB en tampón citrato 205 mM, pH 4,0, que contenía 0,012% (v/v) de H₂O₂. Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100 µL 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}).

6. Producción de anticuerpos monoclonales

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 20 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). 25 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

30 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 1 min en frío, los linfocitos se lavaron 2 veces con medio completo (con suero) frío y se filtraron para eliminar los 5 coágulos formados.

La línea de mieloma P3-X63-Ag8.653 fue cultivada los días previos a la fusión en medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) suplementado [2 mM L-alanina-L-glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales, 25 µg/mL gentamicina, suero bovino fetal (SBF) 10% (v/v)], manteniendo las células en fase de crecimiento exponencial, de 10 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 fusionante químico PEG1500 (1 mL por bazo, 1 min), que al disolver parcialmente las 15 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 20 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 25 de los sobrenadantes de los pocillos sembrados, con objeto de identificar cuáles contenían hibridomas secretores de anticuerpos capaces de reconocer citrínina 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.

30 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 5.

- 5 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 citrinina e inhibición de la señal igual o superior al 80% en el ensayo en presencia de citrinina. Adicionalmente, para todos los pocillos positivos se llevó a cabo un segundo cribado más exhaustivo en modo
10 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 citrinina 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
15 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 citrinina 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
20 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
25 vial (2-4 viales para cada hibridoma) en una disolución de SBF con DMSO 10% (v/v) como agente crioprotector. Los viales se mantuvieron a -80 °C en el interior de una caja de poliestireno durante 24 h antes de pasarlos al contenedor de nitrógeno líquido.

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
5 confluencia, y una vez agotados los nutrientes del medio de cultivo se procedió a recoger el contenido de las placas. El volumen recogido se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se precipitó mediante la adición de un volumen de una disolución saturada de sulfato amónico, manteniéndose a 4 °C hasta su purificación.

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad con columnas
10 de proteína G siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este propósito, el anticuerpo precipitado se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm (4000×g) y se descartó el sobrenadante. El precipitado que contenía los anticuerpos se redissolvió con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,4 y se filtró con membranas de nitrocelulosa (diámetro de poro 0,45 µm) para eliminar partículas en suspensión. La elución del anticuerpo de la
15 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
20 µg/mL en PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,01% (p/v), que se almacenó a 4 °C. La disolución restante se precipitó con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)], lo cual garantiza su estabilidad a 4 °C durante años.

7. Resultados

7.1. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a 25 citrinina

Para demostrar la idoneidad del conjugado de fórmula (IIa) para la obtención de anticuerpos monoclonales de elevada afinidad hacia citrinina, 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 16 líneas
30 celulares (hibridomas) productoras de anticuerpos monoclonales con elevada afinidad hacia citrinina 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#11a, IIa#11b, IIa#13a, IIa#13b,

Ila#110a, Ila#110b, Ila#111, Ila#112, Ila#21a, Ila#21b, Ila#310, Ila#315, Ila#318, Ila#320, Ila#49 y Ila#411 (anticuerpos monoclonales obtenidos a partir del conjugado de fórmula **Ila**).

7.2. Determinación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales

- 5 Una vez purificados por cromatografía de inmunoafinidad los 16 anticuerpos monoclonales obtenidos, se determinó su afinidad hacia citrínina 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 10 ng/mL) frente a diferentes concentraciones de trazador (30,
- 10 10 y 3 ng/mL). Los valores de IC₅₀ para citrínina 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 IC₅₀ para citrínina, y por tanto una afinidad mayor. En dicho formato de ensayo los mejores anticuerpos mostraron valores de IC₅₀ para citrínina por debajo de 5 nM,
- 15 siendo el anticuerpo con mayor afinidad de entre los producidos a partir del conjugado de fórmula (**Ila**) el mAb **Ila#411** (IC₅₀ = 1,9 nM).

TABLA 3. 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} citrinina (nM)
IIa#11a	10	10	6,9
IIa#11b	10	10	7,9
IIa#13a	10	10	5,5
IIa#13b	10	10	4,5
IIa#110a	10	10	2,4
IIa#110b	10	10	2,0
IIa#111	10	10	3,2
IIa#112	10	10	12,6
IIa#21a	30	10	13,8
IIa#21b	30	10	9,4
IIa#310	10	10	5,3
IIa#315	10	10	2,7
IIa#318	10	10	5,2
IIa#320	10	10	2,7
IIa#49	10	10	9,1
IIa#411	10	10	1,9

Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto que los conjugados de fórmula (IIa) objeto de esta invención son aptos para obtener anticuerpos monoclonales de muy elevada afinidad frente a citrinina, y por lo tanto son muy adecuados para su 5 implementación en diferentes plataformas inmunoanalíticas que permitan la determinación o cuantificación de citrinina a los niveles de sensibilidad más exigentes.

7.3. Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales

Todos los anticuerpos son altamente específicos de citrinina. No se observa 10 reconocimiento de deoxinivalenol, alternariol, zearalenona, ocratoxina A o aflatoxina B1. Este resultado pone de nuevo de manifiesto que los conjugados de fórmula (IIa) objeto de esta invención son aptos para obtener anticuerpos monoclonales específicos de citrinina.

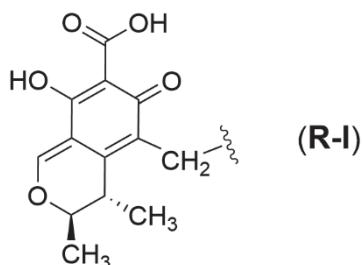
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



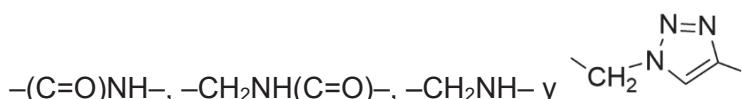
donde

- 5 T es R-I,



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

Z es un grupo funcional seleccionado entre:



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

X está seleccionado entre P y Q, tal que

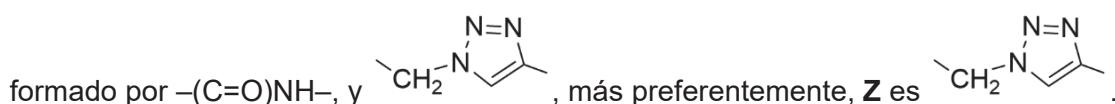
P es un péptido o polipéptido de naturaleza no enzimática, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 Dalton y

Q es un marcador no isotópico detectable.

15

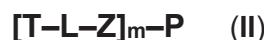
2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 6 átomos de carbono.

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



20

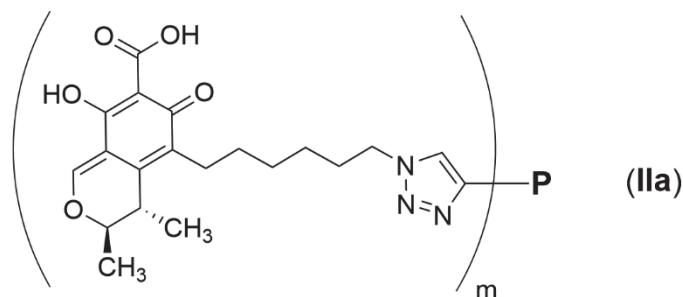
4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido o polipéptido **P** está unido a un soporte.
5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que **m** tiene un valor entre 1 y 20.
- 5 6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un conjugado de un análogo de citrinina de fórmula general (II),



donde

T, L, Z , P y m tienen los mismos significados dados anteriormente en una de las
10 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
15 un conjugado de fórmula (IIa)



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

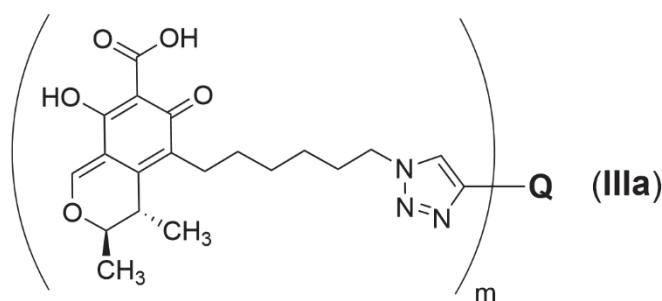
9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, que es un derivado marcado de fórmula (III)



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 aco plado a un sistema de detección indirecta, más 5 preferentemente **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína, un fluoróforo de cianina, u n fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina unéster de acridinio, nanoparticulas cuánticas, y nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

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



10

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 15 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

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.

- 20 15. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 12 a 14 que reconoce citrinina.

16. Uso de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la obtención de un anticuerpo.

17. Uso de un anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende poner en contacto una muestra que contiene citrinina con dicho anticuerpo para el análisis *in vitro* de citrinina.

18. Uso según la reivindicación 17 que comprende:

- 5 **a)** poner en contacto una muestra con el anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15;
- 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
10 **(b).**

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

20. Uso según la reivindicación 19 que comprende:

- 15 **a)** poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-citrinina 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; y
- c)** determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa
20 **(b).**

21. Uso según la reivindicación 20, donde la determinación de la reacción 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.

22. Uso del anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 para
25 la purificación y/o concentración de citrinina de una muestra.

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

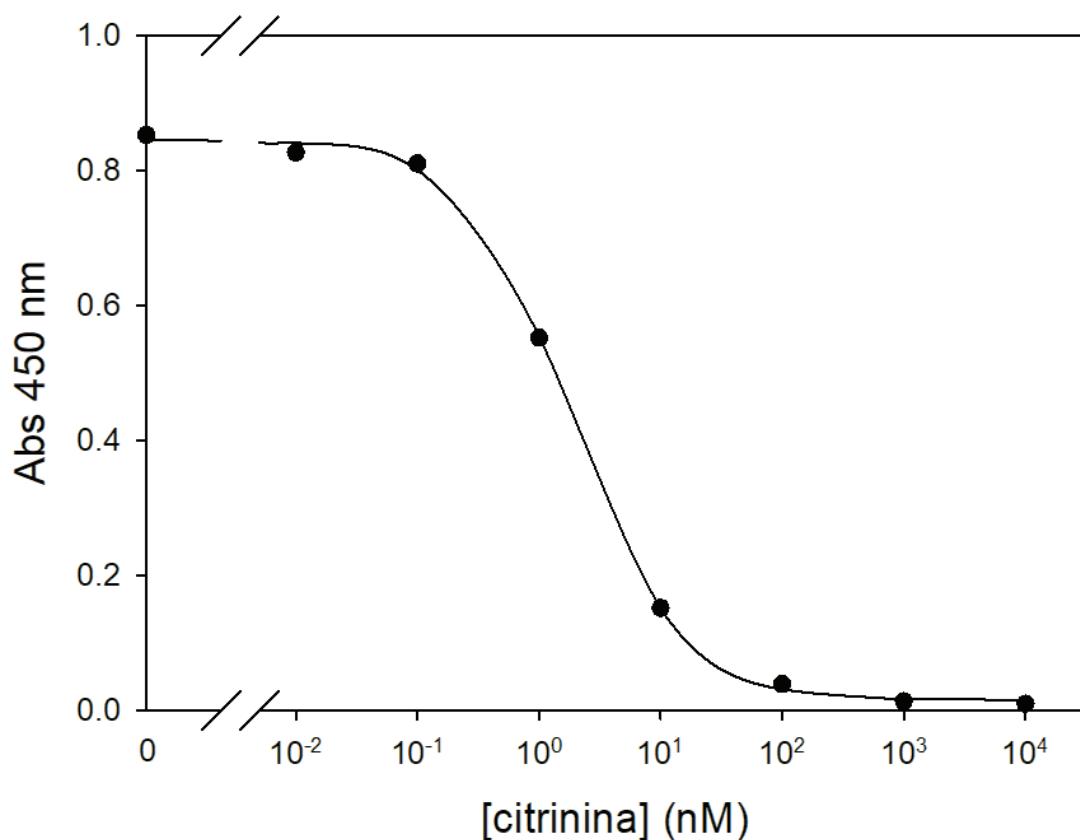
- 28 **a)** inmovilizar al menos un anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 sobre un soporte;
- b)** hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que retenga la citrinina presente en dicha muestra; y

c) eluir la citrinina retenida en el soporte.

24. Kit de detección y/o determinación de citrinina que comprende al menos un anticuerpo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, preferentemente, junto con un compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones

5 1 a 11.

FIGURA 1





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202330902

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2023

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LI, Y. et al. An indirect competitive ELISA for determination of citrinin. Journal of Food Safety, 24/10/2011, Vol. 31, Páginas 497-504, <DOI: 10.1111/j.1745-4565.2011.00326.x>. Ver figura 1, sección materiales y métodos, resultados y conclusiones.	1-24
A	LIU, A. et al. Preparation of CIT-protein conjugates using a novel citrinin derivative as hapten. European Food Research and Technology, 16/11/2011, Vol. 232, Páginas 289-296, <DOI: 10.1007/s00217-010-1385-5>. Ver figura 2 y 8, resumen y sección materiales y métodos.	1-24
A	CN 115160282 B (CHINA NAT CENTER FOR FOOD SAFETY RISK ASSESSMENT et al.) 02/06/2023, resumen y ejemplos 1, 2, 3 y 9.	1-24
A	CN 106749653 A (PERFECT EASE BIOTECH CO LTD) 31/05/2017, Ejemplos 1, 5 y 6.	1-24
A	SHIMUYE, K. Y. et al. The Preparation and Identification of a Monoclonal Antibody against Citrinin and the Development of Detection via Indirect Competitive ELISA. Toxins, 17/03/2017, Vol. 9, Página 110, <DOI: 10.3390/toxins9030110>. Ver resumen, sección 2.1 y 4.2 y conclusiones.	1-24
A	LÓPEZ-PUERTOLLANO, D. et al. Click Chemistry-Assisted Bioconjugates for Hapten Immunodiagnostics. Bioconjugate Chemistry, 25/02/2020, Vol. 31, Páginas 956-964, <DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00099>. Ver esquema 2 y sección procedimientos experimentales.	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 23.09.2024	Examinador B. de Luis Fernández	Página 1/2
--	------------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D311/76 (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