

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 053 558**

21 Número de solicitud: 202430536

51 Int. Cl.:

C07D 451/00 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.06.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.01.2026

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;

NAVARRO FUERTES, Ismael y

SUAY FUENTES, Daniel

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

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

57 Resumen:

Compuestos y anticuerpos para la inmunodetección de dihidroanatoxinas.

La presente invención se refiere a compuestos, especialmente a conjugados y derivados marcados de dihidroanatoxina-a, adecuados para la producción de anticuerpos de elevada afinidad hacia dihidroanatoxinas, particularmente las cianotoxinas dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de conjugados y derivados marcados de dihidroanatoxina-a como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere al uso de los compuestos para el análisis, concentración y extracción de dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a utilizando los anticuerpos obtenidos, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados de dihidroanatoxina-a. Esta invención también proporciona un kit para analizar dihidroanatoxinas, particularmente dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, que comprende anticuerpos frente a estas cianotoxinas, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados de dihidroanatoxina-a.

ES 3 053 558 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS Y ANTICUERPOS PARA LA INMUNODETECCIÓN DE DIHIDROANATOXINAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos, especialmente a conjugados y derivados marcados de dihidroanatoxina-a, adecuados para la producción de anticuerpos de elevada afinidad hacia dihidroanatoxinas, particularmente las cianotoxinas dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de conjugados y derivados marcados de dihidroanatoxina-a como
10 antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere al uso de los compuestos para el análisis, concentración y extracción de dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a utilizando los anticuerpos obtenidos, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados de dihidroanatoxina-a. Esta invención también proporciona un kit para analizar dihidroanatoxinas,
15 particularmente dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, que comprende anticuerpos frente a estas cianotoxinas, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados de dihidroanatoxina-a.

ESTADO DE LA TÉCNICA

20 Las biotoxinas son un tipo de contaminante cuya presencia en alimentos, aguas y piensos representa un verdadero problema para la salud humana y el bienestar animal, ocasionando importantes pérdidas económicas a los sectores agroalimentario, agropecuario y piscícola, y pudiendo afectar gravemente a la salubridad del agua potable. Entre las biotoxinas más relevantes debido a su toxicidad y prevalencia
25 destacan las producidas por cianobacterias, especialmente las microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsinas, saxitoxinas y anatoxinas. Según su modo de acción, las cianotoxinas se pueden clasificar en hepatotóxicas, neurotóxicas, citotóxicas, dermatotóxicas y toxinas irritantes. Más allá de estos efectos también se han descrito alteraciones del olor y problemas gastrointestinales debidos al contacto con
30 cianotoxinas u otros metabolitos de cianobacterias.

Las anatoxinas más relevantes por su toxicidad y presencia en muestras medioambientales son la anatoxina-a, la homoanatoxina-a, la dihidroanatoxina-a y la

dihidrohomoanatoxina-a. Estas toxinas son producidas por diferentes especies de cianobacterias pertenecientes fundamentalmente a los géneros *Tychonema*, *Anabaena*, *Microcoleus*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Raphidiopsis* y *Cylindrospermum*. Bajo ciertas condiciones ambientales, estos microorganismos

5 procariotas son capaces de proliferar de manera exacerbada, dando lugar a eclosiones repentinas, conocidas en la literatura científica como floraciones masivas de algas. Estos afloramientos o *blooms*, en terminología anglosajona, se consideran actualmente más frecuentes e intensos que antaño debido a la eutrofización consecuencia de la actividad humana y al calentamiento global. Las principales vías de exposición de la

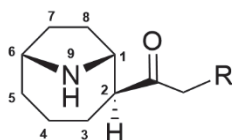
10 población humana y animal a la dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a son a través de agua contaminada, ya sea por ingesta intencionada (agua potable procedente de fuentes superficiales) o accidental (usos recreacionales y deportivos), y a través del consumo de suplementos dietéticos derivados de algas verde-azuladas que no siempre cuentan con los controles adecuados y que pueden por tanto contener cepas no

15 deseadas de cianobacterias productoras de toxinas. Una ruta de exposición que ha adquirido mayor relevancia en los últimos años y que por tanto constituye un riesgo emergente es a través del consumo de pescado y moluscos bivalvos, procedentes tanto de la pesca tradicional como de piscicultura, que se han desarrollado en masas de agua afectadas por plagas de cianobacterias y que por tanto han estado expuestos a estas

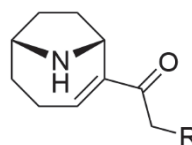
20 biotoxinas.

Tal como se ilustra en las fórmulas a continuación, dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a – en adelante referidas conjuntamente como “dihidroanatoxinas” – son alcaloides con un esqueleto común característico de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano, sustituido en C-2 con un grupo acetilo (COCH_3) en

25 dihidroanatoxina-a y un grupo propionilo (COCH_2CH_3) en dihidrohomoanatoxina-a. Ambas cianotoxinas están estructuralmente relacionadas con los análogos deshidrogenados entre C-2 y C-3, anatoxina-a y homoanatoxina-a. Debido a la elevada basicidad del átomo de nitrógeno puente del sistema azabicclico, todas ellas se encuentran protonadas en el mismo a pH neutro en medio acuoso.



Dihidroanatoxina-a: R = H

Dihidrohomoanatoxina-a: R = CH_3 

Anatoxina-a: R = H

Homoanatoxina-a: R = CH_3

Las dihidroanatoxinas y sus análogos deshidrogenados son potentes neurotoxinas que bloquean los receptores de acetilcolina nicotínica de la membrana postsináptica en la conexión neuromuscular, causando parálisis muscular que conduce a la muerte por asfixia. La dosis letal media (LD_{50}) de dihidroanatoxina-a mediante inyección intraperitoneal es de 0,73 mg/kg, lo que indica una toxicidad reducida en comparación con la anatoxina-a ($LD_{50} = 0,23$ mg/kg). Sin embargo, por vía oral – tanto por sonda como por alimentación – dihidroanatoxina-a es más tóxica que anatoxina-a (LD_{50} por sonda de 2,5 mg/kg para dihidroanatoxina-a y 10,6 mg/kg para anatoxina-a; LD_{50} por alimentación de 8 mg/kg para dihidroanatoxina-a y 25 mg/kg para anatoxina-a) [Puddick et al. *Chemosphere* **2021**, 263, 127937]. Particularmente, la dihidroanatoxina-a se ha revelado como muy tóxica para los perros. A nivel mundial se han reportado numerosas muertes de perros en Francia, EE.UU, Países Bajos por ingestión de agua contaminada con dihidroanatoxina-a. La elevada toxicidad aguda por vía oral de dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a y su presencia en muestras medioambientales, especialmente en primavera [Fastner et al., *Sci. Total Environ.* **2023**, 858, 159433], sugieren que se trata de un importante contaminante que requiere la máxima atención de los organismos encargados de garantizar la salud humana y el bienestar animal.

La determinación analítica de dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a se puede llevar a cabo mediante cromatografía de gases o de líquidos con detectores espectroscópicos, si bien en la mayoría de los casos se requiere derivatizar la toxina. Actualmente, la técnica analítica recomendada para la determinación de estas cianotoxinas en muestras es la cromatografía de líquidos con detector de masas de alta resolución [Testai et al., *EFSA Supporting Publication*, **2016**, EN-998, 309]. Esta técnica presenta una elevada sensibilidad y reproducibilidad, y además permite determinar varias cianotoxinas simultáneamente; no obstante, esta aproximación no está exenta de inconvenientes, como cualquier otra técnica analítica. De hecho, los equipos necesarios son muy costosos, no son portátiles y se requiere de personal altamente cualificado para su manejo. Como estrategia analítica complementaria a los métodos instrumentales, 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 o llevar a cabo controles *in situ* y/o en entornos poco dotados técnicamente. Actualmente existen diversas empresas de inmunodiagnóstico que comercializan ensayos tipo kit para la detección de las principales cianotoxinas – incluyendo anatoxina-a y homoanatoxina-a – con la notable excepción de las dos dihidroanatoxinas, ya que no existen los inmunorreactivos y la tecnología necesarios.

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. Las dihidroanatoxinas, debido a su bajo peso molecular, no son inmunogénicas, y por tanto son incapaces de generar una respuesta inmunitaria por sí misma cuando se inyectan en un animal de experimentación. Para poder generar anticuerpos para estas toxinas es necesario acoplar covalentemente la molécula a una proteína, de forma que el conjugado obtenido sí resulte inmunogénico y permita la producción de anticuerpos. 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.

Como se ha mencionado anteriormente no se han descrito inmunorreactivos específicos de dihidroanatoxinas. Recientemente, se ha publicado la obtención de los primeros conjugados y anticuerpos frente a anatoxina-a [Quiñones-Reyes et al., *Angew. Chim.* **2019**, 58, 9134–9139; Cevallos-Cedeño et al., *Anal. Chem.* **2022**, 94, 10857–10864]. Se trata de anticuerpos altamente específicos de anatoxina-a y homooanatoxina-a, pero que pese a su relativa similitud estructural no reconocen ni a dihidroanatoxina-a ni a dihidrohomoanatoxina-a.

Existe por tanto la necesidad de obtener anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia las dihidroanatoxinas, 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, obtenidos a partir de haptenos novedosos, constituirán la base para desarrollar nuevos métodos inmunoanalíticos para la determinación, detección, concentración o extracción de dihidroanatoxinas, preferentemente mediante la utilización de un kit que pueda ser utilizado por la industria alimentaria, agrícola, clínica y/o medioambiental.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento inmunoanalítico para la determinación de las cianotoxinas dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a 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 estas moléculas con todos los grupos funcionales 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 las moléculas de dihidroanatoxina-a derivatizada a través del átomo de carbono del grupo metilo de la agrupación acetilo – incorporando a dicha posición un brazo espaciador 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 dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, y por tanto adecuados para el desarrollo de procedimientos de inmunodetección de las dos dihidroanatoxinas.

En esta memoria el término “dihidroanatoxinas” se refiere a dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a.

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

En esta memoria se entiende por "análogo de dihidroanatoxina-a" 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 = –COOH, –CH₂NH₂, –CH₂SH, –CH₂N₃.

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

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

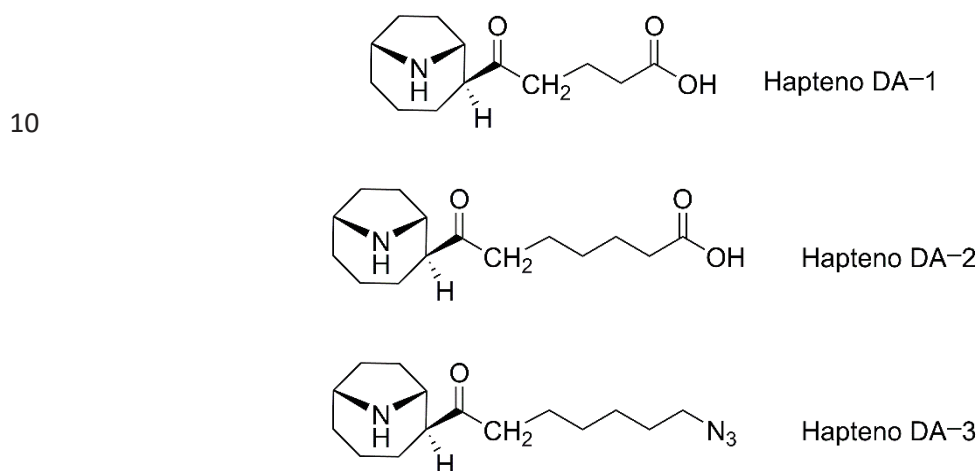
Y = -COOH se transforma en **Z** = -(C=O)NH-

Y = -CH₂NH₂ se transforma en **Z** = -CH₂NH(C=O)- o -CH₂NH-

Y = -CH₂SH se transforma en **Z** = -CH₂SCH- o -CH₂SCH₂-

5 **Y** = -CH₂N₃ se transforma en **Z** = 

A continuación, se ilustran a modo de ejemplo las estructuras de algunos de estos haptenos de fórmula **T-L-Y**, haptenos DA-1, DA-2 y DA-3, que en ningún caso suponen un límite a la variabilidad en la estructura de estos y que incluye todas las alternativas de la fórmula **T-L-Y** definidas previamente:

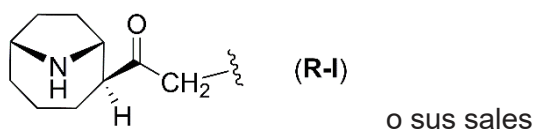


La presente invención se refiere a un compuesto que tiene una fórmula general (I)

15 **[T-L-Z]_m-X (I)**

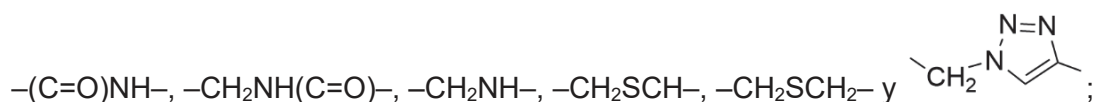
donde

T es **R-I**,



L es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 10 átomos de carbono;

20 **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 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 1 a 5 átomos de carbono.

Las sales de **R-I** pueden ser tanto de ácidos inorgánicos como orgánicos, por ejemplo:

- ácidos inorgánicos monopróticos, como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fluorhídrico, nítrico, perclórico, terafluorobórico, hipofosforoso,

- ácidos inorgánicos polipróticos, como los ácidos sulfúrico, fosfórico, fosforoso, carbónico,

- ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, como los ácidos fórmico, acético, cloroacético, tricloroacético, trifluoroacético, propanoico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, succínico, glutárico, cítrico, acrílico, aspártico, fumárico, maléico,

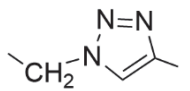
- ácidos mono y dicarboxílicos aromáticos, como los ácidos benzoico, ftálico, nitrobenzoico, dinitrobenzoico, clorobenzoico, nicotínico, hidroxibenzoico, y mandélico,

- ácidos sulfónicos alifáticos o aromáticos, como metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, triflico, metilbenocensulfónico, y dimetilbencenosulfónico.

Ejemplos de sales compatibles con el objeto de la invención incluyen acetato, trifluoroacetato, acrilato, ascorbato, aspartato, benzoato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, bromuro, canforsulfonato, citrato, cloruro/clorhidrato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, ftalato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftalen-2-benzoato, hidroyoduro/yoduro, formiato, fumarato, glicolato, lactato, malato, maleato, malonato, mandelato, metilsulfato, mesilato, nicotinato, nitrato, oxalato, pirofosfato, propionato, fenilpropionato, succinato, sulfato, bisulfato, piro-sulfato, sulfito, bisulfito, sulfonato, bencenosulfonato, clorobencenosulfonato, etanosulfonato, metanosulfonato, naftalen-1-sulfonato,

naftalen-2-sulfonato, p-toluensulfonato, succinato, tartrato, tosilato y sales de fosfato/hidrogenofosfato/dihidrogenofosfato.

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



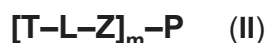
- 5 Más preferentemente, **Z** es $-(C=O)NH-$.

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

- 10 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.

- 15 **m** es preferiblemente un valor entre 1 y 50, más preferiblemente **m** es un valor entre 1 y 25, y especialmente preferible entre 1 y 10.

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



- 20 donde

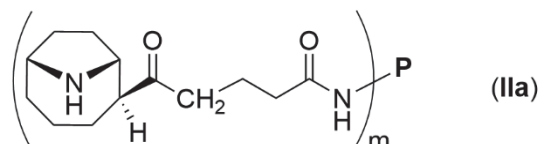
T, **L**, **Z** y **P** tienen los mismos significados dados anteriormente.

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.

- 25 **m** es un número con un valor entre 1 y 100, preferiblemente entre 1 y 50, más preferiblemente entre 1 y 25.

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.

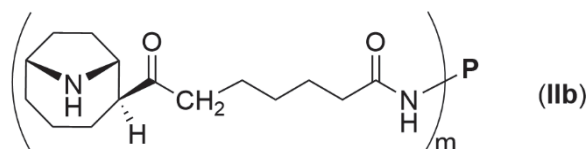
- 5 Según otra realización preferida de la presente invención, el conjugado de fórmula (II) es un conjugado de fórmula (IIa)



donde

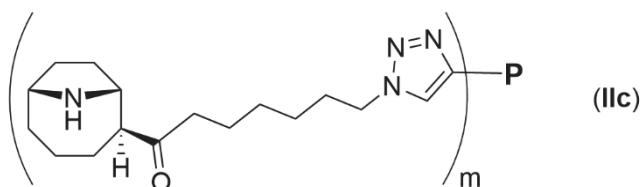
- P** y **m** son como se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 25.

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



donde **P** y **m** son como se han definido previamente para (IIa).

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



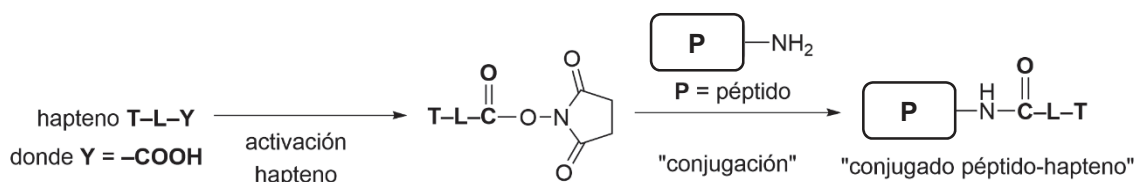
donde **P** y **m** son como se han definido previamente para (IIa).

- El conjugado de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un método que comprende hacer reaccionar el análogo funcionalizado de dihidroanatoxina-a 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.

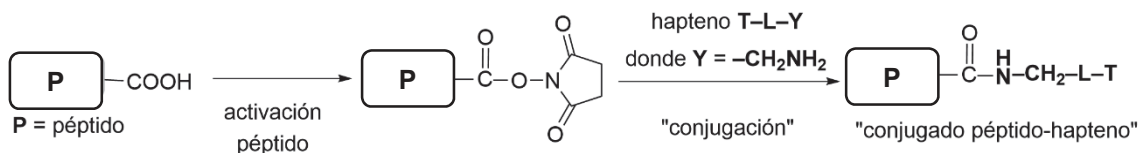
Dependiendo de cuál es el grupo **Y**, la conjugación del hapteno **T-L-Y** al péptido **P** a través de este grupo puede requerir la transformación del mismo en un grupo funcional más reactivo (activación), como en el caso de **Y = -COOH**, o bien del propio péptido **P**, como en el caso de **Y = -CH₂NH₂**. En otros casos, se requiere la incorporación previa al péptido **P** de grupos funcionales adecuados para la reacción con el grupo **Y**, tal es el caso de **Y = -CH₂SH**, y **-CH₂N₃**. Todos estos métodos de conjugación son ampliamente conocidos en la técnica (*Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, London, UK, 2013*).

Por ejemplo, el grupo carboxilo de un hapteno **T-L-Y**, en el que **Y = -COOH**, puede activarse transformándolo en un éster activo, por ejemplo, un éster de *N*-hidroxisuccinimido [$\text{COON}(\text{COCH}_2)_2$], el cual reacciona muy eficazmente con los grupos amino libres (NH_2) de un péptido, tal como se ilustra en el esquema 1:



Esquema 1

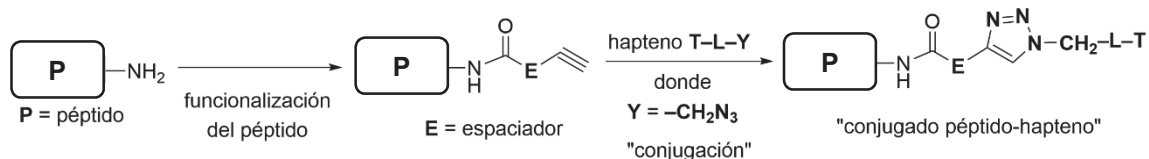
De modo análogo, los grupos amino de un hapteno **T-L-Y**, en el que **Y = -CH₂NH₂**, pueden hacerse reaccionar con los grupos carboxilo libres (COOH) de un péptido previamente activados a través de su transformación en un éster activo, por ejemplo, un éster de *N*-hidroxisuccinimido, tal como se ilustra en el esquema 2:



Esquema 2

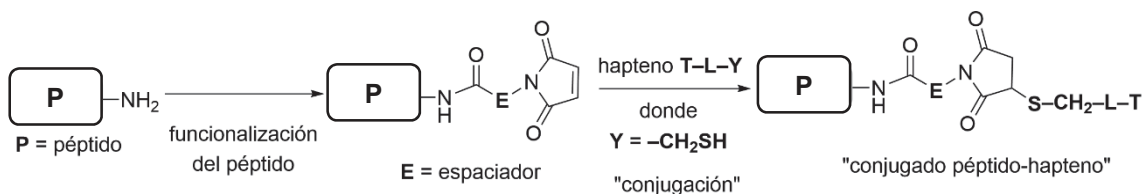
En el caso de un hapteno **T-L-Y**, en el que **Y = -CH₂N₃**, la conjugación del hapteno al péptido puede efectuarse incorporando previamente al mismo un grupo alquino, suficientemente separado de la estructura del péptido con un brazo espaciador que

facilita la reacción del grupo alquino con el grupo azida (N_3) del hapteno, tal como se ilustra en el esquema 3:



Esquema 3

- 5 De modo análogo, en el caso de un hapteno **T-L-Y**, en el que **Y** = $-CH_2SH$, la conjugación del hapteno al péptido puede efectuarse incorporando previamente al mismo un grupo capaz de reaccionar con el grupo tiol (SH), por ejemplo, un grupo maleimido [$N(COCH)_2$], tal como se ilustra en el esquema 4:



Esquema 4

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 un compuesto como **A'** o el análogo oxidado **A**, ambos compuestos interconvertibles a través de procesos de oxidación-reducción, cómo se muestra en el esquema 5:



Esquema 5

- En estos compuestos, **L** tiene el mismo significado dado anteriormente para (I) y (II) y **G** es un grupo funcional de los habitualmente utilizados para la protección de grupos amino (NH), como, por ejemplo, *tert*-butoxicarbonilo (CO_2CMe_3 , Boc), bencilo (CH_2Ph , Bn), etc (P. G. M. Wuts and T. W. Greene, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, EE.UU., páginas 696–926, **2007**).

A partir del compuesto **A'**, el grupo hidroximetileno terminal ($-\text{CH}_2\text{OH}$) puede transformarse fácilmente por métodos ampliamente conocidos en la técnica sintética en cualquiera de los grupos funcionales definidos previamente como **Y**, un grupo funcional seleccionado entre $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{SH}$, y $-\text{CH}_2\text{N}_3$. Por ejemplo, el grupo

5 hidroximetileno ($-\text{CH}_2\text{OH}$) se puede oxidar directamente al grupo $-\text{COOH}$, con oxidantes como oxígeno en presencia de un catalizador como platino, o transformarlo en un grupo $-\text{CH}_2\text{N}_3$ a través de la previa transformación del grupo hidroxilo primario en un grupo sulfonato ($-\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{R}'$) y posterior sustitución del grupo sulfonato por un anión azida (N_3^-) mediante reacciones convencionales de sustitución nucleofílica

10 alifática. El grupo $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ puede prepararse también a partir del grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$, a través del mismo sulfonato intermedio, por sustitución nucleofílica del grupo sulfonato con un nucleófilo nitrogenado, como NH_3 o un equivalente sintético del mismo, o incluso a partir del propio grupo $-\text{CH}_2\text{N}_3$ mediante reacciones conocidas de reducción del grupo azida (N_3) a amino (NH_2), por ejemplo, vía hidrogenación catalítica o por tratamiento con

15 Ph_3P . De forma análoga, el grupo $-\text{CH}_2\text{SH}$ puede introducirse a través del mismo sulfonato mediante sustitución nucleofílica del grupo sulfonato por un grupo sulfhidrilo (SH), bien directamente utilizando NaSH como nucleófilo o indirectamente utilizando un nucleófilo tiolado equivalente sintético del mismo, por ejemplo, CH_3COSK o $(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{S}$.

Alternativamente, a partir del compuesto **A**, el grupo formilo terminal ($-\text{CH}=\text{O}$) puede

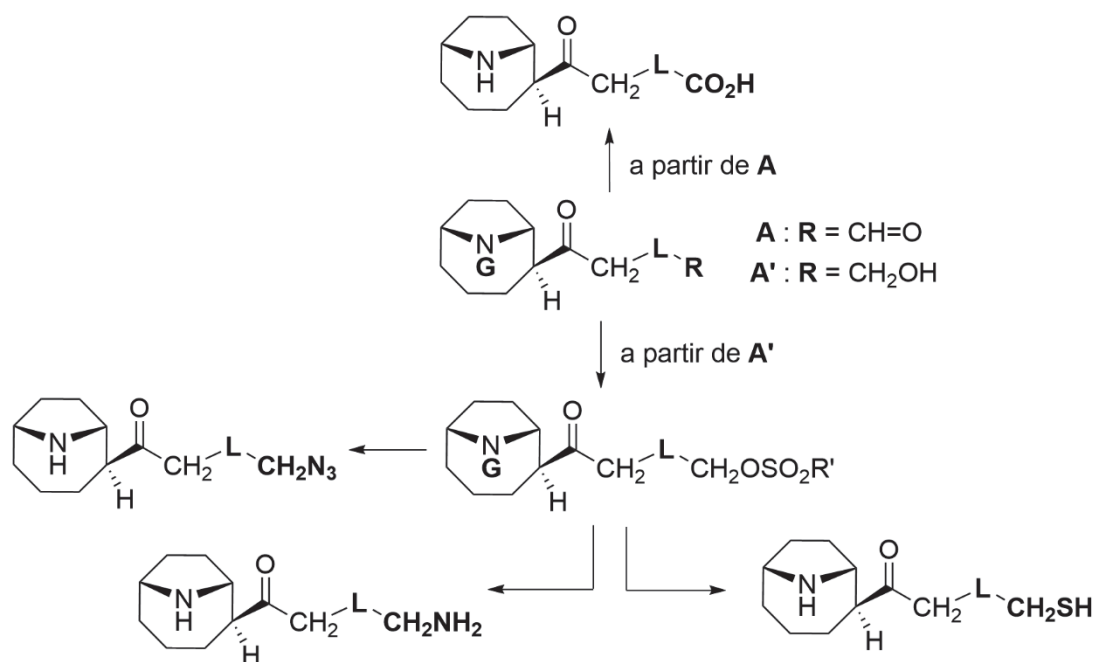
20 oxidarse directamente al grupo **Y** = $-\text{COOH}$ con reactivos como AgNO_3 , NaClO_2 o CrO_3 , o puede reducirse al grupo hidroximetileno (**R** = $-\text{CH}_2\text{OH}$) mediante alguno de los reactivos reductores habitualmente utilizados para realizar esta transformación, por ejemplo, NaBH_4 , $\text{LiAlH}[\text{OC}(\text{CH}_3)_3]_3$ o $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$, para posteriormente transformar este grupo en cualquiera de los grupos funcionales definidos previamente como **Y**, tal como

25 se ha mencionado previamente.

Ejemplos de estas interconversiones de grupos funcionales, ilustradas en el esquema 6, se describen, por ejemplo, en Delcanale et al., *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 567–569, para transformar $-\text{CH}=\text{O}$ en $-\text{COOH}$; Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 29, 10948–10962, para transformar $-\text{CH}=\text{O}$ en $-\text{CH}_2\text{OH}$; Shao et al., *J. Agric. Food Chem.* **1993**,

30 41, 1391–1396, para transformar $-\text{CH}_2\text{OH}$ en $-\text{CO}_2\text{H}$; Wang et al., *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 10013–10021, para transformar $-\text{CH}_2\text{OH}$ en $-\text{CH}_2\text{N}_3$; Minamoto et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1990**, (11), 3027–3033 para transformar $-\text{CH}_2\text{OH}$ a través del sulfonato intermedio en $-\text{CH}_2\text{NH}_2$; Kerns et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12608–12609, para transformar $-\text{CH}_2\text{N}_3$ en $-\text{CH}_2\text{NH}_2$; Wängler et al., *J. Med. Chem.* **2014**, 57,

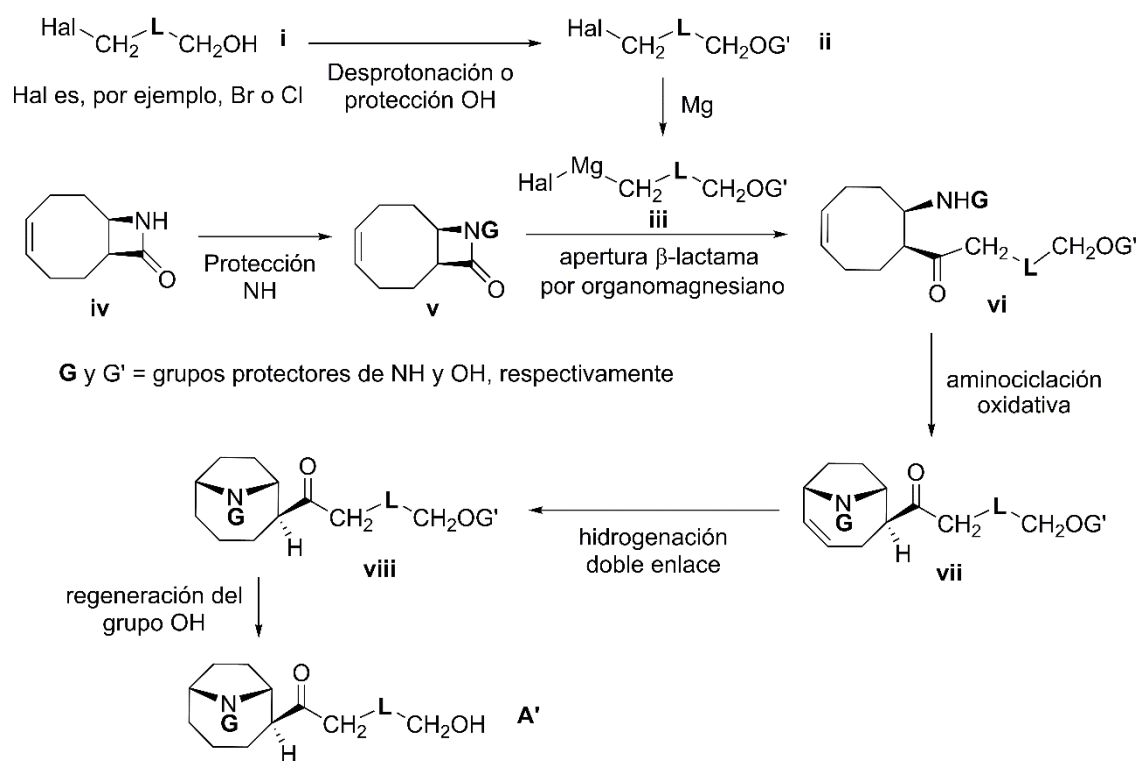
4368–4381 para transformar $-\text{CH}_2\text{OH}$ en $-\text{CH}_2\text{SH}$ a través también del mismo sulfonato intermedio:



Esquema 6

- 5 Tal como se ilustra en el esquema 7, la síntesis del intermedio **A'**, con la cadena hidrocarbonada finalizada en un grupo hidroximetileno ($\text{R} = \text{CH}_2\text{OH}$), puede efectuarse a partir de bromo- o cloro-alcoholes (**i**), donde **L** tiene el mismo significado dado anteriormente, y 9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-ona (**iv**). Tanto los bromo- y cloro-
- 10 lactama **iv** son productos conocidos que están disponibles comercialmente. La síntesis se inicia con la derivatización adecuada del grupo hidroximetileno del bromo- o cloro-alcohol **i**, bien transformándolo en el correspondiente grupo alcóxido por tratamiento con una base fuerte, por ejemplo, NaH ($\text{G}' = \text{Na}$) o CH_3MgCl ($\text{G}' = \text{MgCl}$), o protegiéndolo, por ejemplo, como éter de tetrahidropirranilo ($\text{G}' = \text{THP}$), de *tert*-butildimetilsililo ($\text{G}' = \text{Si}^t\text{BuMe}_2$) o de bencilo ($\text{G}' = \text{CH}_2\text{Ph}$), para dar un intermedio tal como **ii**, seguido de la
- 15 transformación de este en el correspondiente organomagnesiano **iii**. Por otro lado, el grupo NH de la β -lactama **iv** se protege también adecuadamente con un grupo **G**, del tipo de los indicados previamente, para obtener el derivado β -lactámico **v**. La adición nucleofílica del organomagnesiano **iii** al grupo carbonilo de la β -lactama derivatizada **v**
- 20 con apertura concomitante del anillo β -lactámico conduce a la cetona **vi**, a partir de la que se completa la construcción del sistema azabíclico característico mediante una aminociclación oxidativa regioselectiva que conduce al intermedio insaturado **vii**. La

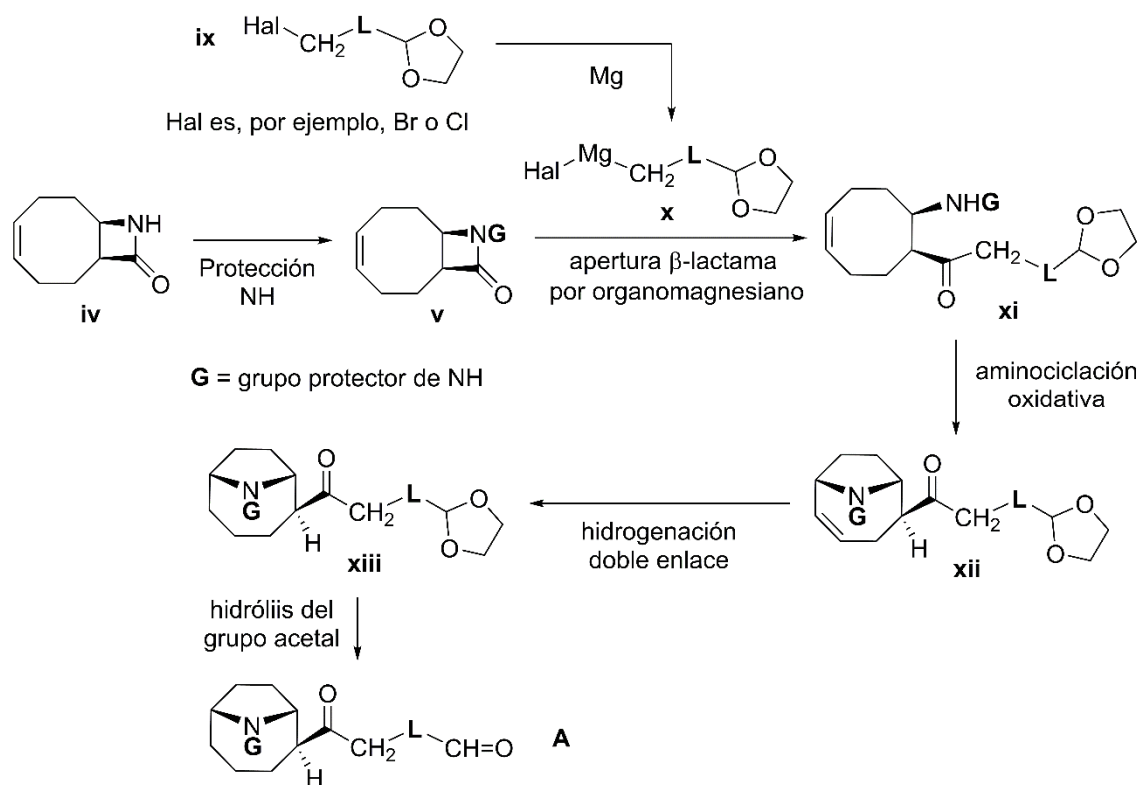
síntesis del intermediario **A'** se completa a partir del producto formado en la reacción anterior mediante hidrogenación del doble enlace y desprotección del grupo hidroxilo terminal del derivado hidrogenado formado **viii**, según el esquema 7:



5

Esquema 7

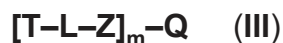
Tal como se ilustra en el esquema 8, la síntesis de un intermediario como **A**, con la cadena hidrocarbonada finalizada en un grupo formilo (**R** = CH=O), puede efectuarse mediante una estrategia sintética análoga, pero partiendo de un bromo- o cloro-acetal (**ix**), donde **L** tiene el mismo significado dado anteriormente, y 9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-ona (**iv**). Los bromo- y cloro-acetales **ix**, para una longitud de **L** de entre 1 y 10 átomos de carbono son también productos conocidos que están disponibles comercialmente. La síntesis del intermediario **A** se inicia con la transformación del bromo- o cloro-acetal **ix** en el correspondiente organomagnesiano **x**, que se hace reaccionar con el grupo carbonilo de la β -lactama N-derivatizada **v** para proporcionar la cetona **xi**, a partir de la que se completa la construcción del sistema azabíclico mediante una aminociclación oxidativa regioselectiva que conduce al intermediario insaturado **xii**. La síntesis del intermediario **A** se completa a partir del producto formado en la reacción anterior mediante hidrogenación del doble enlace para dar **xiii** e hidrólisis del grupo acetal de este al grupo formilo:



Esquema 8

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 específico de las dihidroanatoxinas para determinar o detectar estas cianotoxinas 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 dihidroanatoxina-a **T-L-Y** definido anteriormente. Cuando el material portador es un marcador no isotópico detectable, el derivado del análogo de dihidroanatoxina-a 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 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 50, más preferiblemente entre 1 y 25, y especialmente preferible entre 1 y 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.

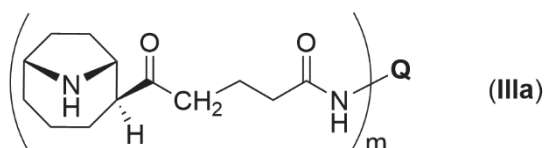
En la presente invención se entiende por "marcador" cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica analítica. En la presente invención, **Q** identifica un fragmento de una molécula, o una molécula química detectora, marcadora o trazadora no isotópica.

- 10 En una realización preferida, **Q** está seleccionado entre: una enzima, biotina, un compuesto luminiscente, un fluoróforo, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta. Preferentemente, **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un 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 polipéptido, que actúa como catalizador de reacciones bioquímicas.

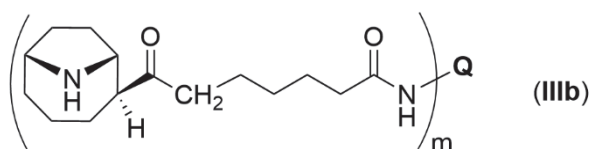
- 20 Un sistema de detección indirecta es un sistema que no mide directamente el parámetro deseado, sino que se obtiene su valor a través de las medidas de un parámetro distinto.

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



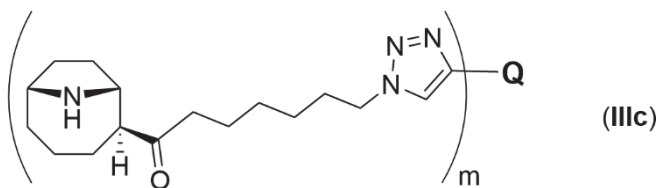
- 25 donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, fosfatasa, oxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

Según otra realización preferida, el derivado de fórmula (III) es un derivado de fórmula (IIIb)



donde **Q** y **m** son como se ha definido previamente para (IIIa).

Según otra realización preferida, el derivado de fórmula (III) es un derivado de fórmula (IIIc)



donde **Q** y **m** son como se ha definido previamente para (IIIa).

El derivado marcado de fórmula (III) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un análogo funcionalizado de dihidroanatoxina-a de fórmula **T-L-Y** (hapteno), donde **T**, **L** e **Y** se han definido anteriormente, con **Q**, un marcador no isotópico, por métodos análogos a los mencionados previamente para la preparación de conjugados de un péptido y que también son ampliamente conocidos en la técnica (Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, London, UK, **2013**).

Este compuesto de fórmula (III) puede utilizarse junto con un anticuerpo específico de dihidroanatoxinas para determinar o detectar estas cianotoxinas 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 dihidroanatoxinas, concretamente dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, así como para desarrollar inmunoensayos para analizar dichas cianotoxinas, se han preparado análogos funcionalizados de dihidroanatoxina-a 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 azabíciclico de la molécula de dihidroanatoxina por un espaciador **L**. La posición por la que se une el espaciador **L** a la estructura de la dihidroanatoxina

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 la dihidroanatoxina al sistema inmunitario. Determinar cuál es la mejor posición de la estructura de la dihidroanatoxina para incorporar el espaciador

5 **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 de la agrupación acetilo de dihidroanatoxina-a. 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
10 dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, 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 dichas cianotoxinas.

En el contexto de esta invención el término “anticuerpo” se refiere a la inmunoglobulina
15 que un animal genera o que sintetiza una célula híbrida (como 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
20 son generados en respuesta al conjugado de fórmula (IIa) o (IIb).

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).

25 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
30 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 ambas dihidroanatoxinas.

Los términos “anticuerpo anti-dihidroanatoxina-a” y anti-dihidrohomoanatoxina-a” o “anticuerpos anti-dihidroanatoxinas” se refieren a anticuerpos capaces de unirse a dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a.

5 En una realización particular, el valor de IC_{50} hacia dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a de los anticuerpos de la invención 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.

10 En una realización particular el anticuerpo de la invención presenta el mismo o diferente valor de IC_{50} para dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, pudiendo ser inferior para una de las dos dihidroanatoxinas.

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 dihidroanatoxinas. En particular, el uso comprende poner en contacto una muestra que contiene
15 dihidroanatoxinas con dicho anticuerpo; y más específicamente comprende:

- 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
20 etapa (b).

En una realización particular la muestra que contiene dihidroanatoxinas puede comprender dihidroanatoxina-a o dihidrohomoanatoxina-a.

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
25 dihidroanatoxinas mediante ELISA competitivo. En particular, este uso comprende:

- a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo anti-dihidroanatoxinas y con el compuesto de fórmula (II) o el derivado marcado de fórmula (III) definido anteriormente;
- b) incubar la muestra, el anticuerpo y el compuesto de la etapa (a) durante un
30 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 dihidroanatoxinas mediante cromatografía de flujo lateral. Preferiblemente, este uso comprende las siguientes etapas:

- 5 a) poner en contacto una 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.
- 10 Otro aspecto adicional de la invención se refiere al uso del anticuerpo definido anteriormente para la purificación y/o concentración de dihidroanatoxinas 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 las dihidroanatoxinas presentes en dicha muestra. La elución
- 15 posterior de las dihidroanatoxinas retenidas 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:
- 20 a) inmovilizar al menos un anticuerpo obtenido a partir de conjugados de fórmula (II) de la invención sobre un soporte;
 b) hacer pasar una muestra a través de dicho soporte para que el anticuerpo retenga las dihidroanatoxinas presentes en dicha muestra; y
 c) eluir las dihidroanatoxinas retenidas por el anticuerpo en el soporte.
- 25 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.

Un aspecto adicional de la presente invención también se refiere a un kit de detección de dihidroanatoxinas 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 las cianotoxinas dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a en una muestra. Asimismo, los usos descritos en la presente invención permiten analizar el contenido de dihidroanatoxinas en diferentes tipos de

muestras, por ejemplo, muestras medioambientales tales como aguas continentales, y muestras de alimentos tales como suplementos dietéticos preparados con algas. Preferentemente, la presente invención proporciona un método de análisis *in vitro* de dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a en agua.

- 5 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.

- 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). El término “antígeno” en esta solicitud de patente se refiere a una molécula capaz de interaccionar específicamente con un anticuerpo. La interacción o reacción
- 10
- 15 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.

- 20 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. Los términos “la” o “las” pueden referirse a uno o a una pluralidad de los elementos que
- 25 modifican (por ejemplo, “las dihidroanatoxinas” puede significar dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a).

- A continuación se ilustra con algunos ejemplos la forma en que puede efectuarse la preparación de análogos funcionalizados de dihidroanatoxina-a de fórmula **T-L-Y** (haptenos) y los correspondientes conjugados de fórmula (II) y (III), que no pretenden
- 30 que sean limitativos de la presente invención, y que sirven para mostrar no sólo la forma en que puede efectuarse la preparación de los mismos sino también la importancia que puede tener la naturaleza estructural del conjugado de fórmula (II) y (III) para la producción de anticuerpos de afinidad y especificidad adecuadas hacia

dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, aptos para el desarrollo de un método inmunoanalítico eficaz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **Fig. 1.** Curvas estándar para dihidroanatoxina-a (línea continua) y dihidrohomoanatoxina-a (línea discontinua) en el formato de ELISA competitivo directo usando el anticuerpo monoclonal **Ila**#17, producido a partir del conjugado (**Ila**) donde **P** es BSA (conjugado BSA_DA-1), con el trazador enzimático (**IIIb**) donde **Q** es HRP (conjugado HRP_DA-2).

10

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 dihidroanatoxinas y el desarrollo de un
15 inmunoensayo de elevada sensibilidad y selectividad para las mismas. 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

- 20 **1.1. Reactivos, equipos y técnicas generales utilizadas en la preparación de los haptenos y conjugados**

Todos los disolventes anhidros se secaron utilizando métodos estándar. Las reacciones sensibles al aire y la humedad se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno utilizando material previamente secado en horno a 135 °C durante la noche. El progreso
25 de las reacciones se realizó 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 flash, que se realizó en gel de sílice 60 (tamaño de
30 partícula 40–63 µm) con los solventes indicados en cada caso. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se registraron a 25 °C, en el disolvente indicado, a 300/75 MHz

(espectrómetro Bruker Avance III 300) 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 ppm y 77,16 ppm, respectivamente). Se utilizó una combinación de experimentos COSY y HSQC editado para asignar los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C . Las multiplicidades de los espectros de ^1H se dan empleando las siguientes abreviaturas: singlete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt), doble quintuplete (dq), doble doble doblete (ddd), doble triplete doblete (dtd) y doble doblete triplete (ddt). 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

Los enantiómeros naturales (1*R*,2*S*,6*R*)-dihidroanatoxina-a y (1*R*,2*S*,6*R*)-dihidrohomoanatoxina-a de referencia se sintetizaron a partir de (1*S*,8*R*,*Z*)-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-ona (Forro et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 15, 2875–2880), según el procedimiento utilizado previamente para la preparación de los análogos racémicos (Mann et al., *Toxicon* **2012**, 60, 1404–1414). 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 policlonal anti-inmunoglobulina de ratón (GAM) 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.

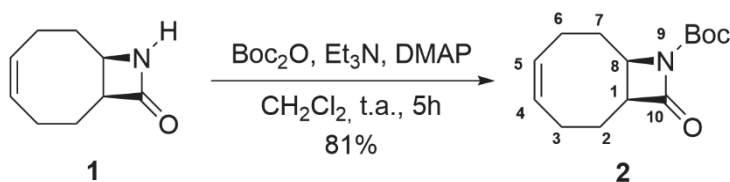
UU.). Los pocillos de microplacas se lavaron con un lavador de microplacas ELx405 también de BioTek Instruments.

2. Preparación de conjugados proteicos de fórmula (II)

Ejemplo 2.1. Preparación de conjugados de fórmula (II) para **T = R-I**, **L = -CH₂CH₂-**
Z = -(C=O)NH- y **P = BSA (seroalbúmina bovina) y OVA (ovoalbúmina).**

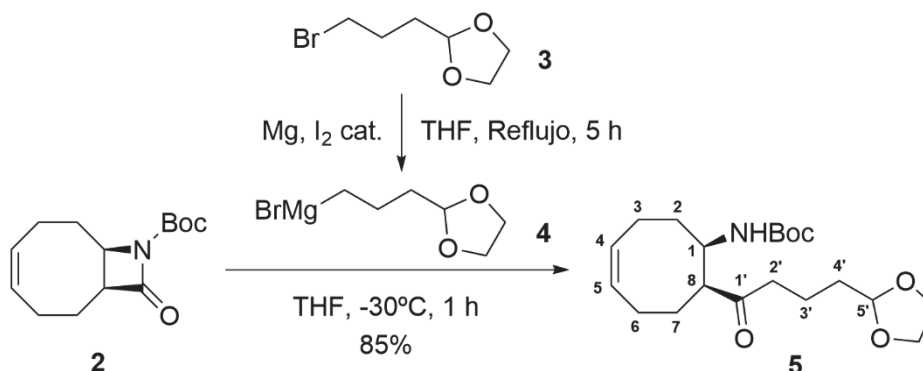
2.1.1. Preparación del éster activo del hapteno de fórmula **T-L-Y** para **T = R-I**, **L = -CH₂CH₂-** e **Y = -COOH** (éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-1).

2.1.1.1. Preparación de (1*S*,8*R*,*Z*)-10-oxo-9-azabicyclo[6,2,0]dec-4-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (**2**).



A una disolución de la β -lactama (1*S*,8*R*,*Z*)-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-ona (Forro et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 15, 2875–2880) [(–)-**1**, 239 mg, 1,58 mmol] y DMAP (192,8 mg, 1,58 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (3,6 mL) a 0 °C bajo nitrógeno se le adicionó Boc₂O (730 μ L, 3,16 mmol) y Et₃N (220 μ L, 1,58 mmol). La disolución resultante se dejó alcanzar temperatura ambiente y se agitó durante 5 horas. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se decantó sobre una disolución de HCl 1 M (10 mL) y se agitó cuidadosamente. Una vez cesó la emisión de gases, la fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CHCl₃. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía (gel de sílice, CHCl₃/MeOH 99:1) para obtener la β -lactama protegida **2** (322,2 mg, 81%) como un sólido blanco amorfo. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5,86-5,55 (m, 2H, H-4 y H-5), 4,08 (ddd, *J* = 11,5, 6,3 y 4,1, Hz, 1H, H-8), 3,29 (dt, *J* = 11,5 y 5,8 Hz, 1H, H-1), 2,48 (dtd, *J* = 13,6, 4,0 y 7,0, Hz, 1H, H-7), 2,44-2,36 (m, 2H, H-3 y H-6), 2,15-2,01 (m, 4H, H₂-2, H'-3 y H'-6), 1,90 (ddt, *J* = 13,6, 11,2 y 6,6, Hz, 1H, H'-7), 1,49 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 168,4 (C-10), 148,3 (CO₂ Boc), 130,6 y 130,8 (C-4 y C-5), 83,0 (CMe₃ Boc), 56,4 (C-8), 52,9 (C-1), 28,2 (CMe₃ Boc), 27,9 (C-7), 24,3 (C-3), 23,7 (C-2), 22,6 (C-6), EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₁₄H₂₂NO₃ [M+H]⁺ 252,1594, encontrado 252,1595.

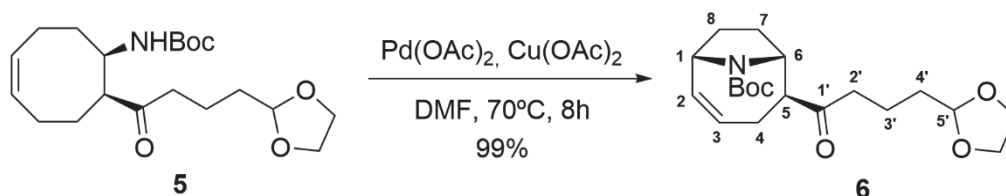
2.1.1.2. Preparación de (1*R*,8*S*,*Z*)-8-(4-(1,3-dioxolan-2-il)butanoil)cyclooct-4-en-1-il)carbamato de terc-butilo (5**).**



A una suspensión de virutas de Mg (126,4 mg, 5,2 mmol) en THF seco (2,5 mL) se
 5 adicionó un cristal de I₂, seguido del bromo-acetal **3** (350 µL, 2,58 mmol) y la mezcla se
 reflujo durante 5 horas bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución grisácea resultante
 se dejó alcanzar temperatura ambiente antes de su uso y se valoró con ácido benzoico
 usando 4-(fenilazo)difenilamina (PDA) como indicador, obteniéndose una concentración
 0,16M del organomagnesiano **4**.

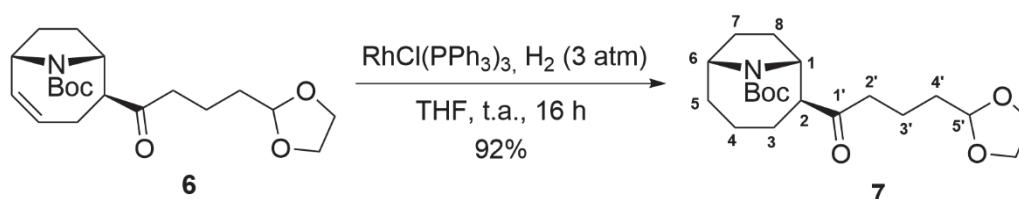
Una disolución del organomagnesiano **4** (3,5 mL, 0,560 mmol) se adicionó gota a gota
 10 sobre una disolución agitada de la β-lactama **2** (109,5 mg, 0,435 mmol) en THF seco
 (0,5 mL) a -30 °C bajo nitrógeno y la mezcla resultante se dejó con agitación durante 1
 hora a la misma temperatura. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con una
 disolución saturada de NH₄Cl y agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas
 15 reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se
 concentraron a vacío. El crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía (gel
 de sílice, hexano/acetato 8:2) para obtener la cetona **5** (135 mg, 85%) como un aceite
 incoloro. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo
 carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de
 20 ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5,74-5,56 (m, 2H, H-4 y H-5), 4,86 (s ancho, 1H, NH Boc), 4,81
 (t, *J* = 4,3 Hz, 1H, H-5'), 4,13 (s ancho, 1H, H-1), 3,92 y 3,80 (cada uno m, cada uno 2H,
 OCH₂CH₂O), 2,83 (d ancho, *J* = 8,8 Hz, 1H, H-8), 2,60-2,42 (m, 2H, H₂-2'), 2,42-2,28 (m,
 2H, H-3 y H-6), 2,20-1,94 (m, 4H, H-2, H'-3, H'-6 y H-7), 1,80-1,58 (m, 6H, H'-2, H'-7,
 H₂-3' y H₂-4'), 1,39 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 212,3 (C-1')
 25 155,2 (CO₂ Boc), 130,2 y 129,5 (C-4 y C-5), 104,4 (C-5'), 79,4 (CMe₃ Boc), 64,91 y 64,92
 (OCH₂CH₂O), 53,2 (C-8), 50,0 (C-1), 41,1 (C-2'), 33,3 (C-4'), 33,1 (C-2), 28,4 (CMe₃
 Boc), 26,0 (C-7), 25,5 (C-6), 23,9 (C-3), 18,2 (C-3'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para
 C₂₀H₃₄NO₅ [M+H]⁺ 368,2431, encontrada 368,2427.

2.1.1.3. Preparación de (1S,5S,6R)-5-(4-(1,3-dioxolan-2-il)butanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de terc-butilo (6).



Una suspensión de la cetona **5** (135 mg, 0,367 mmol), Pd(OAc)₂ (23,6 mg, 0,096 mmol),
 5 Cu(OAc)₂ (150,9 mg, 0,83 mmol) en DMF (1,2 mL) se agitó a 70 °C durante 8 horas bajo
 atmósfera de nitrógeno. Tras finalizar, la mezcla de reacción se diluyó con AcOEt y se
 filtró por gel de sílice. El filtrado se lavó con agua, seguida de pequeñas porciones de
 LiCl al 1,5% y salmuera. Tras secarse sobre MgSO₄ anhidro y concentrarse a presión
 reducida, se obtuvo el alqueno aza-bicíclico **6** (133 mg, 99%) como un aceite amarillento
 10 que se empleó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Por RMN se observa que
 se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se
 dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5,63 (m, 1H,
 H-3), 5,56 (m, 1H, H-2), 4,81 (t, *J* = 4,4 Hz, 1H, H-5'), 4,67 (dd ancho, *J* = 7,2 y 3,6 Hz ,
 1H, H-1), 4,43 (dt ancho, *J* = 8,6 y 2,9 Hz, 1H, H-6), 3,92 y 3,80 (cada uno m, cada uno
 15 2H, OCH₂CH₂O), 2,68-2,56 (m, 1H, H-5), 2,56-2,46 (m, 2H, H₂-2'), 2,46-2,34 (m, 2H, H-
 4 y H-7), 2,15-2,04 (m, 1H, H'-4), 1,92-1,77 (m, 2H, H'-7 y H-8), 1,74-1,58 (m, 5H, H'-8,
 H₂-3' y H₂-4'), 1,38 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 209,1 (C-1'),
 153,4 (CO₂ Boc), 132,5 (C-2), 125,6 (C-3), 104,3 (C-5'), 80,1 (CMe₃ Boc), 64,9
 (OCH₂CH₂O), 62,2 (C-5), 57,7 (C-1), 54,8 (C-6), 40,1 (C-2'), 34,2 (C-7), 33,1 (C-4'), 29,6
 20 (C-8), 28,3 (CMe₃ Boc), 24,4 (C-4), 18,4 (C-3'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para
 C₂₀H₃₂NO₅ [M+H]⁺ 366,2275, encontrado 366,2281.

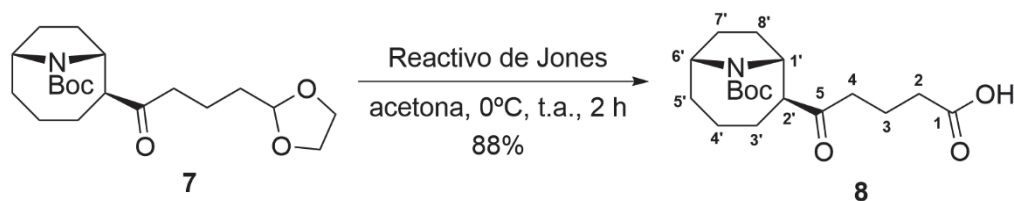
2.1.1.4. Preparación de (1R,2S,6R)-2-(4-(1,3-dioxolan-2-il)butanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-9-carboxilato de terc-butilo (7).



25

Una disolución del alqueno azabíclico **6** (79,6 mg, 0,217 mmol) y el catalizador de Wilkinson (28,5 mg, 0,03 mmol) en THF anhidro (3 mL) se introdujo en un reactor “tinyclave” de Büchi equipado con agitación magnética y se presurizó a 3 atm con H₂ a temperatura ambiente y se mantuvo con agitación vigorosa durante 16 horas. El reactor se despresurizó y la mezcla de reacción se llevó a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía (gel de sílice, hexano/acetato 7:3) para obtener el compuesto **7** (73,4 mg, 92%) como un aceite amarillento. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4,78 (m, 1H, H-5'), 4,36 (d ancho, *J* = 9,0 Hz, 1H, H-1), 4,29 (d ancho, *J* = 9,2 Hz, 1H, H-6), 3,88 y 3,77 (cada uno s ancho, cada uno 2H, OCH₂CH₂O), 2,61-2,42 (m, 2H, H₂-2'), 2,39-2,15 (m, 2H, H-2 y H-8), 2,03-1,92 (m, 1H, H-7), 1,82-1,69 (m, 4H, H-4, H-5, H'-7 y H'-8), 1,68-1,62 (m, 2H, H₂-3'), 1,62-1,53 (m, 3H, H-3 y H₂-4'), 1,45-1,32 (m, 3H, H'-3, H'-4 y H'-5), 1,32 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 209,9 (C-1'), 153,2 (CO₂ Boc), 104,3 (C-5'), 79,8 (CMe₃ Boc), 64,8 (OCH₂CH₂O), 61,0 (C-2), 56,1 (C-6), 55,4 (C-1), 40,3 (C-2'), 35,6 (C-8), 33,1 (C-4'), 32,4 (C-5), 28,2 (CMe₃ Boc), 26,3 y 26,2 (C-3 y C-7), 22,1 (C-4), 18,4 (C-3'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₂₀H₃₄NO₅ [M+H]⁺ 368,2431, encontrado 368,2434.

2.1.1.5. Preparación del ácido (1'R,2'S,6'R)-5-(9-(terc-butoxicarbonil)-9-azabíciclo[4.2.1]nonan-2-il)-5-oxopentanoico (8**).**

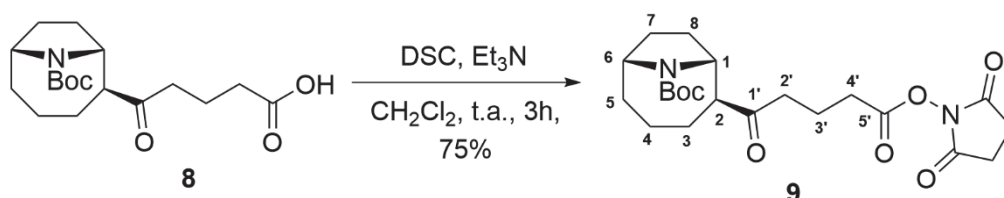


A una disolución agitada del acetal **7** (33,8 mg, 0,092 mmol) en acetona (2 mL) enfriada a 0 °C se adicionó el reactivo de Jones gota a gota con pipeta Pasteur (34 gotas, 1 gota/mg de **7**) y la mezcla resultante se dejó alcanzar temperatura ambiente, observándose la aparición de un precipitado verdoso. Una vez finalizada la reacción (monitorizada por CCF, CHCl₃/Metanol 9:1), la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con CHCl₃, las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras eliminar el disolvente a presión reducida, el residuo obtenido se purificó por cromatografía (gel de sílice, CHCl₃/MeOH 9:1) para obtener el ácido **8** (27,7 mg, 88%) como un aceite incoloro. Por RMN se observa que se trata de

una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 4,42 (d ancho, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-1'), 4,37 (d ancho, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-6'), 2,81-2,50 (m, 2H, H₂-4), 2,45-2,27 (m, 4H, H₂-2, H-2', y H-8'), 2,09-1,95 (m, 1H, H-7'), 1,95-1,69 (m, 6H, H₂-3, H-3', H-4', H-5' y H'-8'), 1,67-1,38 (m, 4H, H'-3', H'-4', H'-5' y H'-7'), 1,42 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 209,7 (C-5), 178,3 (C-1), 153,3 (CO₂ Boc), 80,1 (CMe₃ Boc), 61,3 (C-2'), 56,3 (C-6'), 55,6 (C-1'), 39,5 (C-4), 35,8 (C-8'), 33,2 (C-2), 32,6 (C-5'), 28,6 (CMe₃ Boc), 26,40 y 26,34 (C-3' y C-7'), 22,2 (C-4'), 19,1 (C-3); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₁₈H₃₀NO₅ [M+H]⁺ 340,2118, encontrado 340,2124.

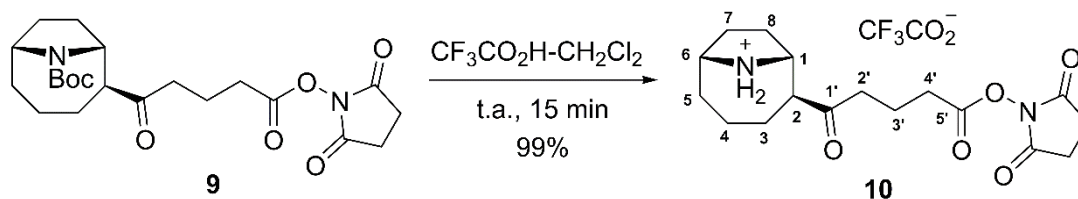
10

2.1.1.6. Preparación de (1R,2S,6R)-2-(5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentanoil)-9-azabicyclo [4.2.1]nonan-9-carboxilato de terc-butilo (9).



A una disolución del ácido **8** (8,8 mg, 0,026 mmol) y carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (9,7 mg, 0,038 mmol) en CH_2Cl_2 (325 μL) se adicionó Et_3N (9,2 mg, 12,6 μL , 0,091 mmol) a 0 °C bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó alcanzar temperatura ambiente con agitación durante 3 horas, se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y salmuera y se secó sobre MgSO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida, se obtuvo el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **9** (8,5 mg, 75%) como un aceite incoloro que se empleó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 4,42 (d ancho, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-1), 4,37 (d ancho, $J = 6,4$ Hz, 1H, H-6), 2,84 (s ancho, 4H, COCH₂CH₂CO), 2,80-2,55 (m, 4H, H₂-2' y H₂-4'), 2,45-2,36 (m, 1H, H-8), 2,36-2,26 (m, 1H, H-2), 2,12-1,97 (m, 3H, H₂-3' y H-7), 1,93-1,68 (m, 4H, H-3, H-4, H-5 y H'-8), 1,66-1,35 (m, 4H, H'-3, H'-4, H'-5 y H'-7), 1,38 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 209,2 (C-1'), 169,2 (COCH₂CH₂CO), 168,5 (C-5'), 153,3 (CO₂ Boc), 80,0 (CMe₃ Boc), 61,4 (C-2), 56,3 (C-6), 55,6 (C-1), 38,8 (C-2'), 35,8 (C-8), 32,6 (C-5), 30,2 (C-4'), 28,4 (CMe₃ Boc), 26,4 y 26,2 (C-3 y C-7), 25,7 (COCH₂CH₂CO), 22,2 (C-4), 19,1 (C-3'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₂₂H₃₃NO₇ [M+H]⁺ 437,2282, encontrado 437,2272.

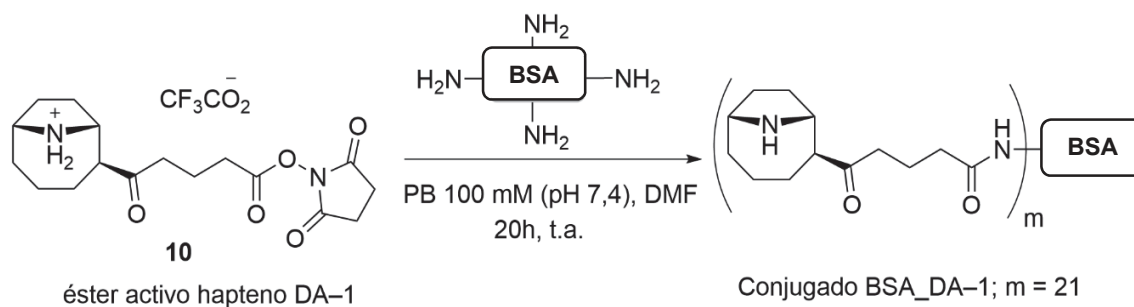
2.1.1.7. Preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-1 como sal del ácido trifluoroacético (10**).**



El éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **9** (8,0 mg, 0,018 mmol) se disolvió en una mezcla 3:1
 5 de CH₂Cl₂ anhidro y CF₃CO₂H (300 µL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Seguidamente, la mezcla de reacción se llevó a sequedad en el rotavapor y el exceso de CF₃CO₂H se eliminó por ciclos de dilución y concentración con benceno anhidro (3 veces). El residuo resultante se mantuvo a alto vacío durante toda la noche para proporcionar el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-1 como
 10 sal de trifluoroacetato (**10**, 8,1 mg, 99%) como un aceite amarillento. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 10,21 (s, 1H, NH), 8,36 (s, 1H, NH), 4,55 (s ancho, *J* = 10,2 Hz, H-1), 4,25 (s ancho, 1H, H-6), 2,83 (s ancho, 4H, COCH₂CH₂CO), 2,78-2,71 (m, 2H, H-2), 2,78-2,55 (m, 4H, H₂-2' y H₂-4'), 2,56-2,46 (m, 1H, H-8), 2,39-2,30 (m, 1H, H-7), 2,28 (dt, *J* = 14,7, 7,4 Hz, 1H, H-3), 2,08-1,97 (m, 1H, H-5), 1,99 (quintuplete, *J* = 7,0 Hz, 2H, H₂-3'), 1,96-1,76 (m, 4H, H'-3, H-4, H'-7 y H'-8), 1,76-1,61 (m, 2H, H'-4 y H'-5); RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 210,2 (C-1'), 169,3 (COCH₂CH₂CO), 168,4 (C-5'), 161,8 (c, *J* = 35,8 Hz, CF₃CO₂), 116,5 (c, 291,8 Hz, CF₃CO₂), 58,5 (C-6), 56,6 (C-1), 54,5 (C-2), 38,5 (C-2'), 32,0 (C-5), 30,8 (C-8), 29,9 (C-4'), 28,0 (C-7), 26,8 (C-3), 25,7 (COCH₂CH₂CO), 21,3 (C-4), 18,5 (C-3'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₁₇H₂₅N₂O₅ [M-CF₃CO₂]⁺
 15 337,1758, encontrado 337,1756.
 20

2.1.2. Preparación de conjugados del hapteno DA-1 con proteínas

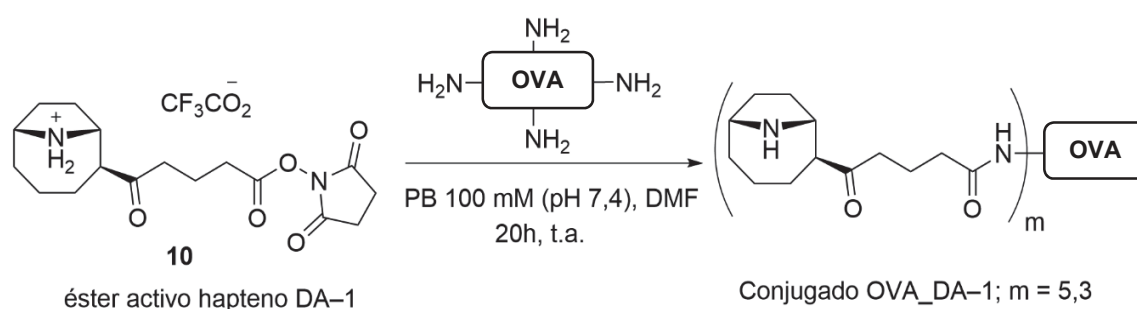
2.1.2.1. Preparación del conjugado del hapteno DA-1 con BSA [conjugado BSA_DA-1].



Una disolución aproximadamente 50 mM en DMF del éster activo del hapteno DA-1 (**10**, 136 μ L) obtenido en la reacción anterior, se añadió lentamente y con agitación sobre 1,21 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón fosfato 100 mM, pH 7,4 (PB). La reacción de conjugación se incubó durante 20 horas con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el bioconjugado de BSA formado 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 μ m y se llevaron a una concentración final de 3 mg/mL con tampón de elución filtrado y se almacenaron a -20 °C.

Para determinar la carga hapténica (m) obtenida en el conjugado, una alícuota de 33,3 μ L de la disolución del conjugado BSA_DA-1 purificado se diluyó a 100 μ L con agua desionizada y se dializó (diálisis contra 5 L de agua desionizada con al menos 3 a 4 cambios de agua por 24 horas a 4 °C); finalmente, el producto dializado se utilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número medio de moléculas de hapteno DA-1 acopladas por molécula de BSA mediante MALDI-TOF-MS (m = 21, ver Tabla 2, entrada 1).

2.1.2.2. Preparación del conjugado del hapteno DA-1 con OVA [conjugado OVA_DA-1].



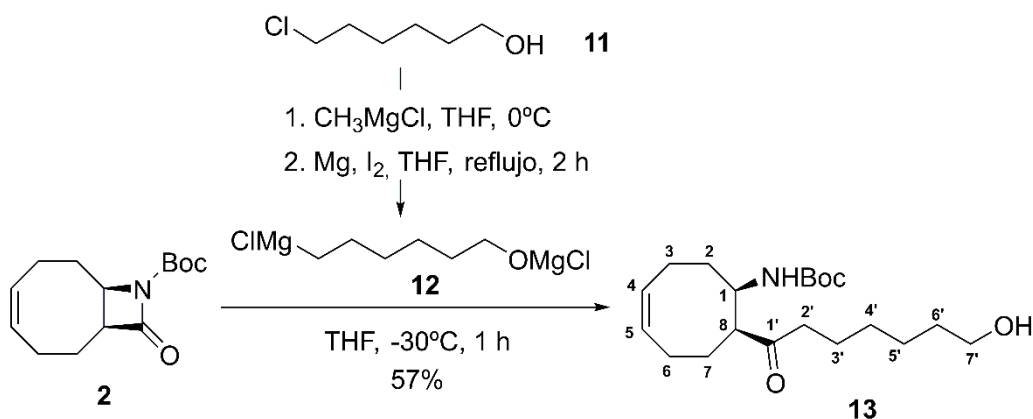
136 μ L de una disolución 50 mM en DMF del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-1 (**10**) añadió lentamente y con agitación a un volumen de 2,13 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en PB. Después de 20 horas de reacción en agitación lenta a temperatura ambiente, el conjugado formado se 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 de $100\text{ }\mu\text{L}$ del conjugado OVA_DA-1 recién purificado se dializó y el número medio de moléculas de hapteno DA-1 por molécula de OVA se determinó mediante MALDI-TOF-MS ($m = 5,3$, ver Tabla 2, entrada 3).

Ejemplo 2.2: Preparación de conjugados de fórmula (II) para $\mathbf{T} = \mathbf{R-I}$, $\mathbf{L} = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $\mathbf{Z} = -(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ y $\mathbf{P} = \text{BSA}$ (seroalbúmina bovina) y OVA (ovoalbúmina).

2.2.1. Preparación del éster activo del hapteno de fórmula $\mathbf{T-L-Y}$ para $\mathbf{T} = \mathbf{R-I}$, $\mathbf{L} = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ e $\mathbf{Y} = -\text{COOH}$ (éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del Hapteno DA-2).

2.2.1.1. Preparación de *rac*-(1*R*,8*S*,*Z*)-8-(7-hidroxieptanoil)ciclooct-4-en-1-il)carbamato de *tert*-butilo (**13**).

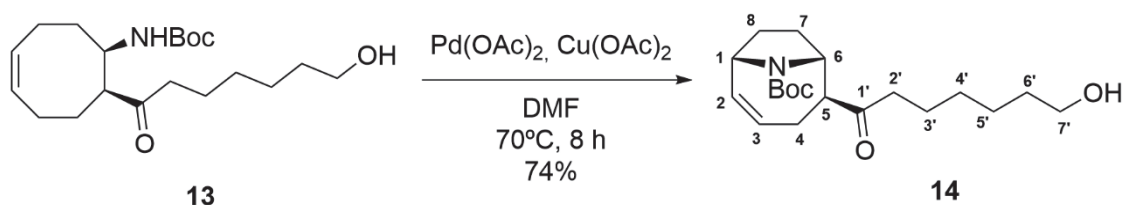


A una suspensión de virutas de Mg ($536,4\text{ mg}$, $21,95\text{ mmol}$) en THF seco (10 mL) enfriada a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo nitrógeno se le adicionó un cristal de yodo y 6-clorohexanol (**11**, $980\text{ }\mu\text{L}$, $1,003\text{ mg}$, $7,3\text{ mmol}$). La mezcla se agitó en las mismas condiciones y se adicionó gota a gota una disolución 3 M de ClMgCH_3 en THF anhidro ($2,8\text{ mL}$, $7,3\text{ mmol}$). Una vez cesó la emisión de gases, la mezcla se reflujo a la temperatura del disolvente durante 2 horas. La disolución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su uso y se valoró con ácido benzoico usando (fenilazo)difenilamina como indicador, obteniéndose una concentración $0,25\text{ M}$ del organomagnesiano **12**.

La disolución recientemente preparada del organomagnesiano **12** (5 mL , $1,25\text{ mmol}$) se adicionó gota a gota sobre una disolución de la β -lactama racémica **2** (236 mg , $1,020\text{ mmol}$) – preparada como se describe en Parsons et al., *Tetrahedron* **1999**, *56*, 309–315 – en THF anhidro (1 mL) a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora en las mismas condiciones, se trató con una disolución saturada

de NH_4Cl y agua y se extrajo con AcOEt . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. El crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía (gel de sílice, hexano/acetato 8:2) para obtener la cetona **13** (181 mg, 57%) como un aceite incoloro. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 5,90-5,67 (m, 2H, H-4 y H-5), 4,83 (s ancho, 1H, NH), 4,16 (s ancho, 1H, H-1), 3,62 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-7}'$), 2,84 (d ancho, $J = 10,6$ Hz, 1H, H-8), 2,58-2,29 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-2}'$, H-3 y H-6), 2,21-1,92 (m, 4H, H-2, H'-3, H'-6 y H-7), 1,83-1,67 (m, 2H, H'-2 y H'-7), 1,61-1,49 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-3}'$ y $\text{H}_2\text{-6}'$), 1,41 (s, 9H, CMe_3 Boc), 1,40-1,24 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-4}'$ y $\text{H}_2\text{-5}'$); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 212,8 (C-1'), 155,2 (CO_2 Boc), 130,5 y 129,4 (C-4 y C-5), 79,5 (CMe_3 Boc), 62,9 (C-7'), 53,0 (C-8), 50,0 (C-1), 41,3 (C-2'), 33,5 (C-2), 32,7 (C-6'), 28,9 (C-5'), 28,5 (CMe_3 Boc), 26,0 (C-7), 25,6 (C-4'), 25,4 (C-6), 24,0 (C-3), 23,7 (C-3'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^{++}$ 354,2639, encontrado 354,2629.

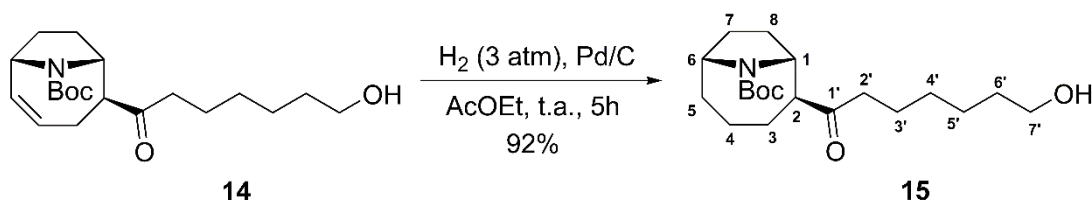
2.2.1.2. Preparación de *rac*-(1*S*,5*S*,6*R*)-5-(7-((hidroxiheptanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (14**)).**



Una suspensión del alqueno **13** (49,7 mg, 0,14 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10,6 mg, 0,028 mmol) y $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (57,3 mg, 0,294 mmol) en DMF (460 μL) se agitó a 70 °C bajo nitrógeno durante 8 horas. Transcurrido ese tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con Et_2O y se filtró a través de gel de sílice, utilizando Et_2O para el lavado. El filtrado y los lavados se reunieron y se lavaron sucesivamente con agua, una disolución acuosa al 1,5% de LiCl y salmuera. Tras secarse sobre MgSO_4 anhidro y concentrarse a presión reducida, se obtuvo el bicyclo **14** (48 mg, 74%) como un aceite amarillento, suficientemente puro por RMN de ^1H para ser utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) 5,65 (m, 1H, H-3), 5,58 (m, 1H, H-2), 4,71 (dd, 1H, dd ancho, $J = 7,3, 3,8$ Hz, H-3), 4,46 (dt ancho, 1H, $J = 8,7, 3,1$ Hz, H-2), 3,64 (t, 2H, $J =$

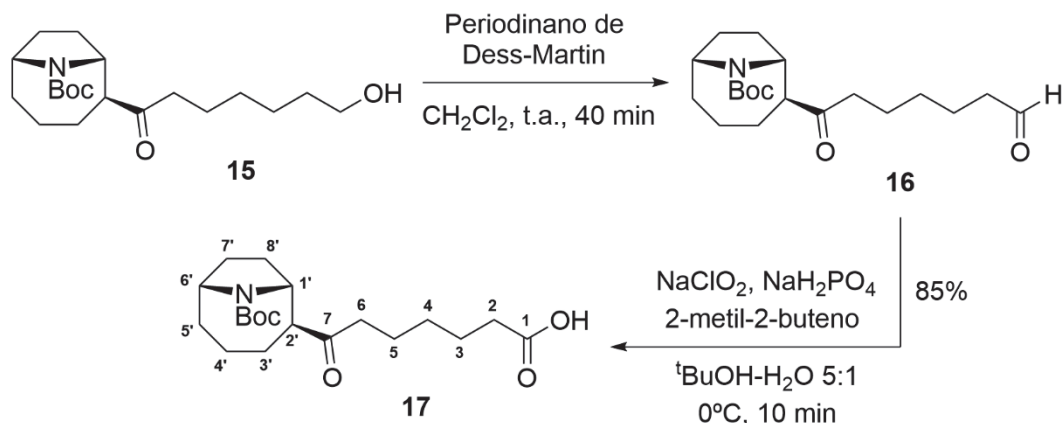
6,3 Hz, H₂-7'), 2,70-2,59 (m, 1H, H-5), 2,58-2,38 (m, 4H, H₂-2', H-4 y H-7), 2,19-2,07 (m, 1H, H'-4), 1,95-1,77 (m, 2H, H'-7 y H-8), 1,73-1,51 (m, 5H, H₂-3', H₂-6' y H'-8), 1,42 (s, 9H, CMe₃ Boc), 1,46-1,25 (m, 4H, H₂-4' y H₂-5'); RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 209,6 (C-1'), 153,5 (CO₂ Boc), 132,6 (C-2), 125,6 (C-3), 80,2 (CMe₃ Boc), 63,0 (C-7'), 62,4 (C-5), 57,8 (C-1), 54,9 (C-6), 40,5 (C-2'), 34,3 (C-7), 32,7 (C-6'), 29,7 (C-8), 29,2 (C-4'), 28,4 (CMe₃ Boc), 25,7 (C-5'), 24,4 (C-4), 23,9 (C-3'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₂₀H₃₅NO₄ [M+H]⁺ 352,2482, encontrado 352,2480.

2.2.1.3. Preparación de *rac*-(1*R*,2*S*,6*R*)-2-(7-hidroxiheptanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-9-carboxilato de *tert*-butilo (**15**).



Una suspensión del alqueno **14** (43 mg, 0,12 mmol) y 10% Pd/C (13,5 mg, 0,012 mmol Pd) en AcOEt (2 mL) se hidrogenó a temperatura ambiente durante 5 horas bajo una presión de hidrógeno de 3 bares en un reactor a presión "tinyclave" de Büchi equipado con agitación magnética. Posteriormente, el reactor se despresurizó y la mezcla se filtró a través de celite, lavando con AcOEt. Tras evaporar el disolvente a vacío, se obtuvo el compuesto azabíciclico saturado **15** (40 mg, 92%) como un aceite incoloro que se empleó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4,42 (d ancho, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1), 4,36 (d ancho, *J* = 6,4 Hz, 1H, H-6), 3,63 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H, H₂-7'), 2,63-2,34 (m, 3H, H₂-2' y H-8), 2,34-2,22 (m, 1H, H-2), 2,04 (m, 1H, H-7), 1,92-1,68 (m, 4H, H-3, H-4, H-5 y H'-8), 1,67-1,51 (m, 6H, H'-3, H₂-3', H₂-6' y H'-7), 1,51-1,27 (m, 6H, H'-4, H'-5, H₂-4' y H₂-5'), 1,39 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 210,6 (C-1'), 153,3 (CO₂ Boc), 80,0 (CMe₃ Boc), 63,0 (C-7'), 61,2 (C-2), 56,3 (C-6), 55,6 (C-1), 40,7 (C-2'), 35,8 (C-8), 32,7 (C-5 y C-6'), 29,2 (C-4'), 28,4 (CMe₃ Boc), 26,41 y 26,37 (C-3 y C-7), 25,8 (C-5'), 24,1 (C-3'), 22,3 (C-4); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₂₀H₃₆NO₄ [M+H]⁺ 354,2639, encontrado 354,2641.

2.2.1.4. Preparación del ácido *rac*-(1'*R*,2'*S*,6'*R*)-7-(9-(*tert*-butoxicarbonil)-9-azabicyclo [4.2.1] nonan-2-il)-7-oxo heptanoico (17).



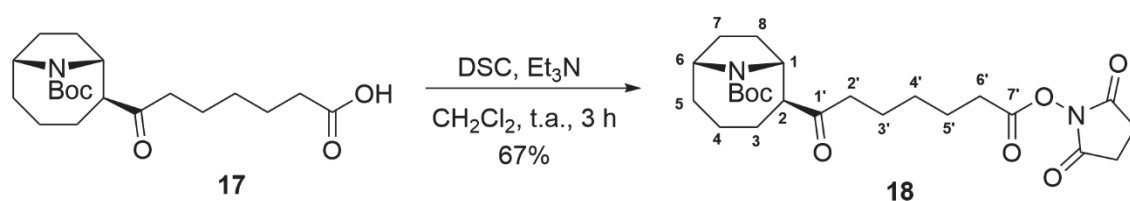
A una disolución del alcohol **15** (25,2 mg, 0,0713 mmol) en CH_2Cl_2 (2,8 mL) se agregó
 5 periodinano de Dess-Martin (36,2 mg, 0,085 mmol) y la mezcla se dejó con agitación a
 temperatura ambiente durante 40 minutos. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción
 se trató con una disolución saturada de Na_2SO_3 (3 mL) y se dejó con agitación 30
 minutos. A continuación, la mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó sucesivamente con
 una disolución de NaHCO_3 al 5%, agua y salmuera. Tras secar la fase orgánica sobre
 10 MgSO_4 anhidro, filtrarse y concentrar a vacío, se obtuvo el aldehído **16** (22,3 mg) como
 un aceite incoloro que inmediatamente se oxidó al correspondiente ácido carboxílico, tal
 como se describe a continuación.

A una disolución del aldehído **16** (22,3 mg, 0,0634 mmol) en una mezcla 5:1 de $t\text{BuOH-H}_2\text{O}$
 (1 mL) enfriada a 0°C se adicionaron de forma consecutiva 2-metil-2-buteno (65
 15 μL , 1,3 mmol), NaH_2PO_4 (26,8 mg, 0,19 mmol) y NaClO_2 (17,9 mg, 0,19 mmol). Una vez
 disueltos los sólidos, la mezcla de reacción se agitó durante 10–15 minutos. Pasado ese
 tiempo, la mezcla de reacción se acidificó con una disolución de KHSO_4 al 10% y se
 extrajo con CHCl_3 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera y se secaron
 sobre MgSO_4 anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a presión reducida, se obtuvo
 20 el ácido **17** (22,4 mg, 85% desde el alcohol **15**) como un aceite incoloro que se empleó
 en la siguiente etapa sin purificación adicional. Por RMN se observa que se trata de una
 mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales
 del rotámero mayoritario. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 4,42 (d ancho, 1H, $J = 8,9$ Hz,
 H-1'), 4,37 (d ancho, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-6'), 2,63-2,46 (m, 2H, H_2 -6), 2,45-2,37 (m, 1H, H-
 8'), 2,35 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, H_2 -2), 2,33-2,22 (m, 1H, H-2'), 2,11-1,98 (m, 1H, H-7'), 1,92-
 25 1,72 (m, 4H, H-3', H-4', H-5' y H'-8'), 1,70-1,55 (m, 5H, H_2 -3, H_2 -5 y H'-7'), 1,55-1,30 (m,
 5H, H'-3', H'-4', H_2 -4 y H'-5'), 1,39 (s, 9H, CMe_3 Boc); RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ

210,4 (C-7), 179,1 (C-1), 153,4 (CO₂ Boc), 80,1 (CMe₃ Boc), 61,2 (C-2'), 56,3 (C-6'), 55,6 (C-1'), 40,5 (C-6), 35,8 (C-8'), 33,7 (C-2), 32,6 (C-5'), 28,8 (C-4), 28,4 (CMe₃ Boc), 26,40 y 26,35 (C-3' y C-7'), 24,6 (C-5), 23,7 (C-3), 22,3 (C-4'); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₂₀H₃₄NO₅ [M+H]⁺ 368,2431, encontrado 368,2420.

5

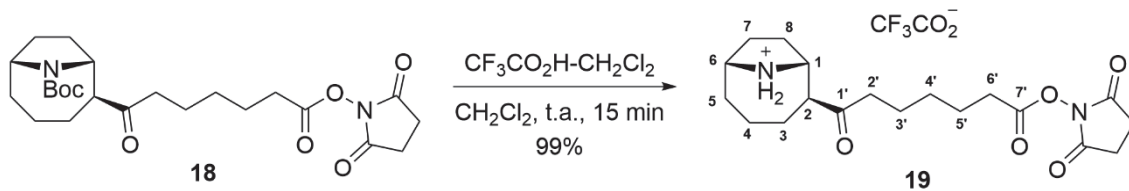
2.2.1.5. Preparación de *rac*-(1*R*,2*S*,6*R*)-2-(7-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-7-oxoheptanoil)-9-azabicyclo [4.2.1]nonan-9-carboxilato de *tert*-butilo (18**).**



A una disolución del ácido **17** (12,5 mg, 0,034 mmol) y carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (13 mg, 0,050 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (430 µL) enfriada a 0 °C bajo nitrógeno se añadió Et₃N (17 µL, 0,012 mmol) y la mezcla resultante se dejó alcanzar lentamente temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y agua y se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄ anhidro. Tras filtrar y eliminar el disolvente a vacío, se obtuvo el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **18** (10,7 mg, 67%) como un aceite incoloro. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4,42 (d ancho, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1), 4,37 (d ancho, *J* = 8,9 Hz, 1H, H-6), 2,83 (s, 4H, COCH₃CH₂CO), 2,60 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, H₂-6'), 2,58-2,44 (m, 2H, H₂-2'), 2,46-2,36 (m, 1H, H-8), 2,34-2,22 (m, 1H, H-2), 2,10-1,98 (m, 1H, H-7), 1,92-1,69 (m, 6H, H-3, H-4, H-5, H'-8 y H₂-5'), 1,67-1,56 (m, 3H, H₂-3' y H'-7), 1,56-1,37 (m, 5H, H'-3, H'-4, H'-5 y H₂-4'), 1,39 (s, 9H, CMe₃ Boc); RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 210,2 (C-1'), 169,3 (COCH₂CH₂CO), 168,6 (C-7'), 153,3 (CO₂ Boc), 80,0 (CMe₃ Boc), 61,2 (C-2), 56,3 (C-6), 55,6 (C-1), 40,4 (C-2'), 35,8 (C-8), 32,6 (C-5), 30,9 (C-6'), 28,6 (C-4'), 28,4 (CMe₃ Boc), 26,42 y 26,33 (C-3 y C-7), 25,7 (COCH₂CH₂CO), 24,6 (C-5'), 23,5 (C-3'), 22,2 (C-4); EMAR (TOF, ESI+) *m/z* calculado para C₂₄H₃₇N₂O₇ [M+H]⁺ 465,2595, encontrado 465,2598.

2.2.1.6. Preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-2 como sal del ácido trifluoroacético (19**).**

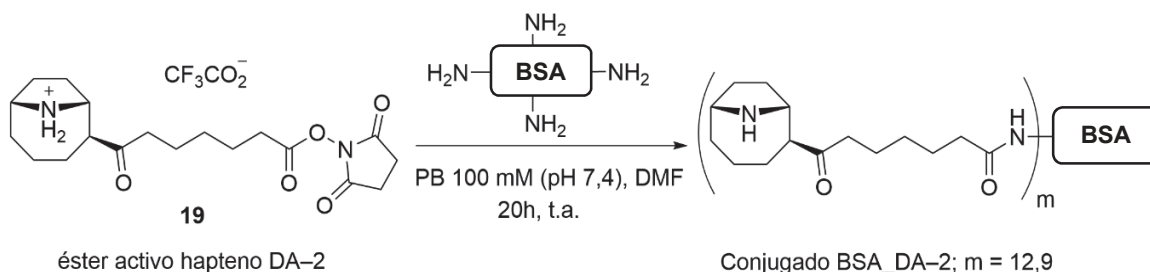
30



El éster **18** (10,7 mg, 0,023 mmol) se disolvió en una mezcla 3:1 de CH₂Cl₂ anhidro y CF₃CO₂H (370 µL) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Seguidamente, la mezcla de reacción se llevó a sequedad en el rotavapor y el exceso de CF₃CO₂H se eliminó por ciclos de dilución y concentración con benceno (3 veces) para obtener el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-2 como sal del ácido trifluoroacético (**19**, 11,7 mg, 99%) como un aceite amarillento. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 10,30 (s, 1H, NH), 7,88 (s, 1H, NH), 4,45 (s ancho, 1H, H-1), 4,26 (s ancho, 1H, H-6), 2,83 (s ancho, 4H, COCH₂CH₂CO), 2,76 (dd, *J* = 9,6, 6,5 Hz, 1H, H-2), 2,60 (td, *J* = 7,2, 1,4 Hz, 2H, H₂-6'), 2,58-2,40 (m, 3H, H₂-2' y H-8), 2,38-2,29 (m, 1H, H-7), 2,24 (dt, *J* = 15,0, 7,6 Hz, 1H), H-3), 2,02 (ddt, *J* = 15,8, 10,3, 4,6 Hz, 1H, H-5), 1,88-1,77 (m, 4H, H'-3, H-4, H'-7 y H'-8), 1,77-1,67 (m, 4H, H'-4, H'-5 y H₂-5'), 1,59 (dq, *J* = 13,9, 6,6 Hz, 2H, H₂-3'), 1,38 (p, *J* = 7,6 Hz, 2H, H₂-4'); RMN de ¹⁹F (471 MHz, CDCl₃) δ -75,4 (CF₃CO₂); RMN de ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 211,7 (C-1'), 169,5 (COCH₂CH₂CO), 168,7 (C-7'), 161,5 (c, *J* = 36,6 Hz, CF₃CO₂), 116,2 (c, 292,2 Hz, CF₃CO₂), 58,3 (C-6), 57,1 (C-1), 53,7 (C-2), 40,5 (C-2'), 32,0 (C-5), 30,8 (C-6'), 30,3 (C-8), 28,4 (C-7), 28,1 (C-4'), 26,8 (C-3), 25,7 (COCH₂CH₂CO), 24,5 (C-5'), 22,8 (C-3'), 21,2 (C-4); EMAR (TOF, ESI+) calculado para C₁₉H₂₉N₂O₅ [M-CF₃CO₂]⁺ 365,2071, encontrado 365,2067.

2.2.2. Preparación de los conjugados del hapteno DA-2 con proteínas

2.2.2.1. Preparación del conjugado del hapteno DA-2 con BSA [conjugado BSA DA-2].

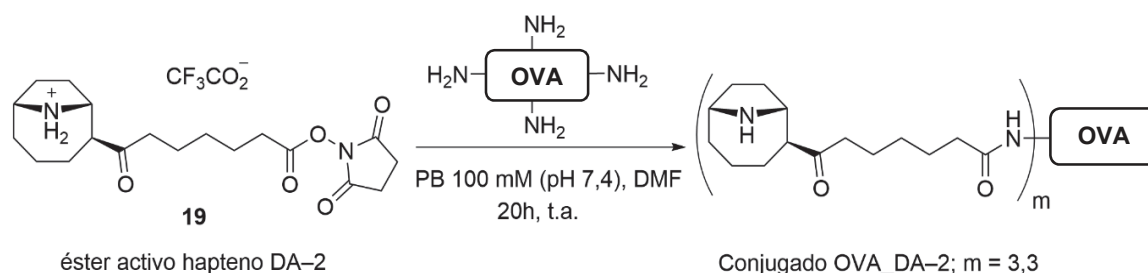


Preparado siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el conjugado BSA_DA-1 (apartado **2.1.2.1**) a partir de 205 µL de una disolución 50 mM en DMF del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-2 (**19**) y 1,5 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en PB. Tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que

contenían el conjugado 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 2 mg/mL con tampón de elución filtrado y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El número medio de moléculas del hapteno DA-2 conjugadas por cada molécula de BSA, determinado por MALDI-TOF-

5 MS, fue de $m = 12,9$ (ver Tabla 2, entrada 2).

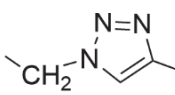
2.2.2.2. Preparación del conjugado del hapteno DA-2 con OVA [conjugado OVA_DA-2].



10 Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado OVA_DA-1 (apartado 2.1.2.2) a partir 122 μL de una disolución 50 mM en DMF del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno DA-2 (**19**) y 1,8 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en PB. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con

15 timerosal al 0,01% (v/v) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El número medio de moléculas del hapteno DA-2 conjugadas por cada molécula de OVA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $m = 3,3$ (ver Tabla 2, entrada 4)

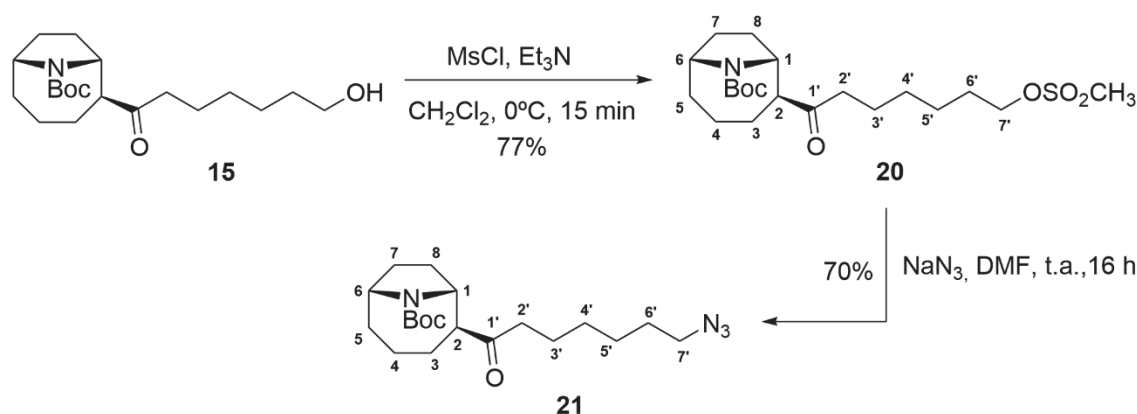
Ejemplo 2.3: Preparación de conjugados de fórmula (II) para $T = R-I$, $L =$

20 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $Z =$  y $P = \text{BSA}$ (seroalbúmina bovina) y OVA (ovoalbúmina).

2.3.1. Preparación del hapteno de fórmula $T-L-Y$ para $T = R-I$, $L =$

$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ e $Y = -\text{CH}_2\text{N}_3$ (Hapteno DA-3).

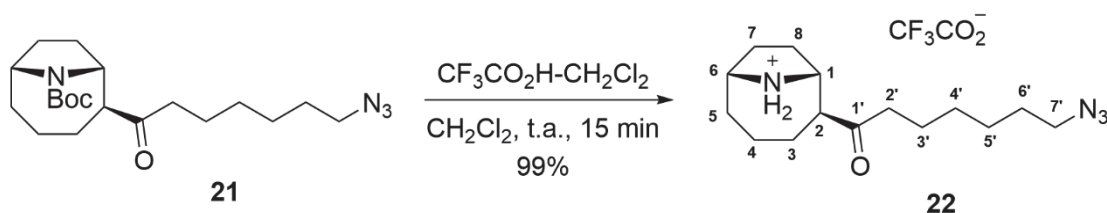
2.3.1.1. Preparación de *rac*-(1*R*,2*S*,6*R*)-2-(7-azidoheptanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-9-carboxilato de *tert*-butilo (**21**).



A una disolución del alcohol **15** (14,4 mg, 0,0407 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (600 μL) se adicionó Et_3N (15 μL , 0,104 mmol) bajo nitrógeno, la mezcla resultante se enfrió a 0°C y se adicionó cloruro de mesilo (4,7 μL , 0,061 mmol) y la agitación se mantuvo a la misma temperatura durante 15 minutos. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó sucesivamente en frío con agua, una disolución 0,5 M de HCl, una disolución saturada de NaHCO_3 y salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a vacío para dar el mesilato **20** (13,4 mg, 76%) como un aceite incoloro que se empleó inmediatamente sin purificación en la siguiente etapa.

Una disolución del mesilato **20** (11, mg, 0,031 mmol) recién preparado y NaN_3 (8,9 mg, 0,13 mmol) en DMF anhidra (500 μL) se mantuvo con agitación 15 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Tras ello, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con CHCl_3 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, posteriormente con una disolución acuosa al 1,5% de LiCl y finalmente con salmuera. Tras secarse sobre MgSO_4 anhidro, filtrarse y concentrar a vacío, el crudo de reacción obtenido se purificó por cromatografía (gel de sílice, CHCl_3) para obtener la azida **21** (7 mg, 70%) como un aceite incoloro. Por RMN se observa que se trata de una mezcla de rotámeros del grupo carbamato y, por simplicidad, solo se dan las señales del rotámero mayoritario. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 4,42 (d ancho, $J = 9,0$ Hz, 1H, H-1), 4,37 (d ancho, $J = 8,8$ Hz, 1H, H-6), 3,26 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-7}'$), 2,62-2,35 (m, 3H, $\text{H}_2\text{-2}'$ y H-8), 2,33-2,23 (m, 1H, H-2), 2,10-1,98 (m, 1H, H-7), 1,92-1,69 (m, 4H, H-3, H-4, H-5 y $\text{H}'\text{-8}$), 1,66-1,28 (m, 12H, $\text{H}'\text{-3}$, $\text{H}'\text{-4}$, $\text{H}'\text{-5}$, $\text{H}'\text{-7}$, $\text{H}_2\text{-3}'$, $\text{H}_2\text{-4}'$, $\text{H}_2\text{-5}'$ y $\text{H}_2\text{-6}'$), 1,39 (s, 9H, CMe_3 Boc); RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 210,4 (C-1'), 153,3 (CO_2 Boc), 80,0 (CMe_3 Boc), 61,3 (C-2), 56,3 (C-6), 55,6 (C-1), 51,5 (C-7'), 40,6 (C-2'), 35,8 (C-8), 32,6 (C-5), 28,8 (CMe_3 Boc), 28,6 (C-6'), 28,4 (C-4'), 26,7 (C-5'), 26,4 y 26,38 (C-3 y C-7), 23,9 (C-3'), 22,3 (C-4); EMAR (TOF, ES+) m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^{++}$ 379,2704, encontrada 379,2697.

2.3.1.2. Preparación del hapteno DA-3 como sal del ácido trifluoroacético (**22**).



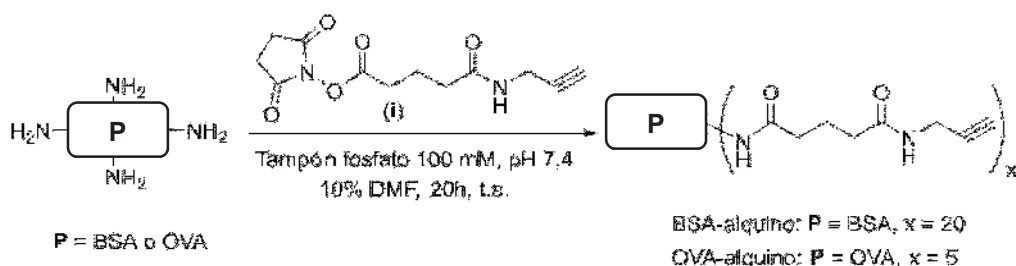
La azida **21** (5,4 mg, 0,014 mmol) se disolvió en una mezcla 3:1 de CH_2Cl_2 anhidro y $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (230 μL) y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos.

- 5 Seguidamente, la mezcla de reacción se llevó a sequedad en el rotavapor y el exceso de $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ se eliminó por ciclos de dilución y concentración con benceno (3 veces) para obtener el hapteno DA-3 como sal de trifluoroacetato (**22**, 5,5 mg, cuantitativo) como un aceite amarillento. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 10,48 y 8,41 (cada uno s ancho, cada uno 1H, NH_2^+), 4,48 (dd, $J = 10,2, 2,5$ Hz, 1H, H-1), 4,27 (dt, $J = 7,1$ y $3,1$ Hz, 1H, H-6), 3,25 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, H_2 -7'), 2,69 (dd, $J = 10,4$ y $6,6$ Hz, 1H, H-2), 2,60-2,30 (m, 4H, H_2 -2', H-7 y H-8), 2,25 (dt, $J = 14,8$ y $7,3$ Hz, 1H, H-3), 2,10-2,00 (m, 1H, H-5), 1,96-1,62 (m, 6H, H'-3, H_2 -4, H'-5, H'-7 y H'-8), 1,62-1,49 (m, 4H, H_2 -3' y H_2 -6'), 1,40-1,25 (m, 4H, H_2 -4' y H_2 -5'); RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 211,2 (C-1'), 162,1 (c, $J = 34,6$ Hz, CF_3CO_2), 116,2 (CF_3CO_2), 58,3 (C-6), 56,6 (C-1), 54,6 (C-2), 51,5 (C-7'), 40,5 (C-2'), 32,0 (C-5), 30,9 (C-8), 28,8 y 28,7 (C-4' y C-6'), 28,0 (C-7), 26,9 y 26,6 (C-3 y C-5'), 23,3 (C-3'), 21,4 (C-4); RMN de ^{19}F (471 MHz, CDCl_3) δ -75,4 (CF_3CO_2); EMAR (TOF, ESI+) calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}$ [$\text{M}-\text{CF}_3\text{CO}_2$] $^+$ 279,2179, encontrado 279,2175.

2.3.2. Preparación del conjugado del hapteno DA-3 con las proteínas BSA y OVA

2.3.2.1. Funcionalización de los grupos amino libres de proteínas con grupos alquino.

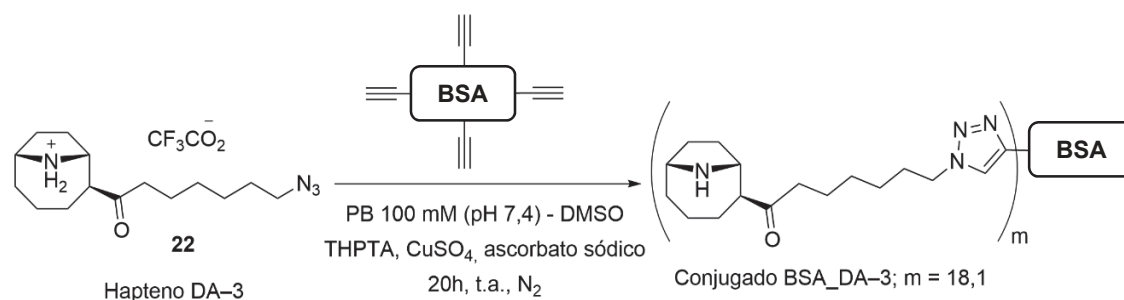
- 20 [Preparación de conjugados BSA-alquino y OVA-alquino]



El éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del ácido 5-oxo-5-(prop-2-in-1-ilamino)pentanoico (**i**), 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 noche a temperatura ambiente, las proteínas alquiladas 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/minuto 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 hapteno:proteína, RM) se calculó mediante MALDI-TOF-MS. Las RM obtenidas para BSA–alquino y OVA–alquino fueron aproximadamente 20 y 5, respectivamente (ver Tabla 2, entradas 7 y 8).

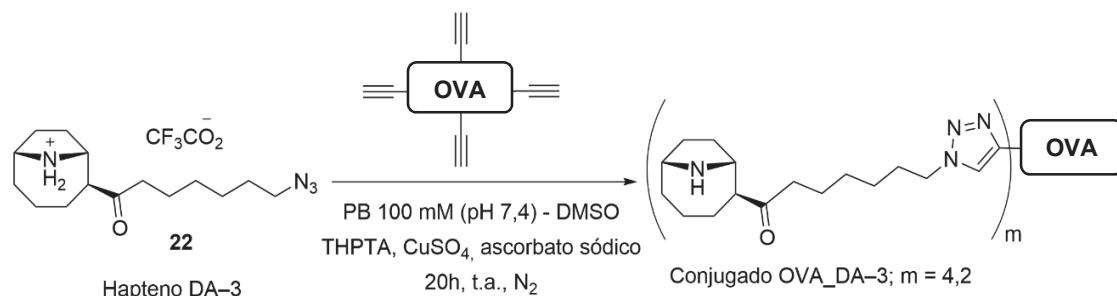
2.3.2.2. Preparación del conjugado del hapteno DA-3 con BSA [conjugado BSA DA-3].



Una disolución del hapteno DA-3 (**22**, 6,0 mg, 15,3 μ mol, 3,8 equivalentes de hapteno por residuo de alquino) en DMSO (790 μ L), se añadieron gota a gota sobre una disolución del conjugado BSA-alquino descrita en el apartado **2.3.2.1** (RM = 20, 15 mg, 4 μ mol de grupos alquino) en PB (31 mL), con agitación a temperatura ambiente. Sobre la disolución resultante se añadieron, gota a gota, 107 μ L de una disolución previamente preparada a partir de disoluciones de *tris*(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina (THPTA, 120 mM, 150 μ L, 18,0 μ mol) y de CuSO₄ (40 mM, 90 μ L, 3,6 μ mol) en agua Milli-Q (2 equivalentes de THPTA y 0,4 equivalentes de CuSO₄ por residuo de alquino). La mezcla resultante se desgasificó mediante ciclos vacío/nitrógeno y se añadieron 317 μ L de una disolución 250 mM de ascorbato sódico en agua Milli-Q (20 equivalentes por grupo de alquino), también desgasificada previamente mediante ciclos vacío/nitrógeno. La disolución resultante se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente, y el conjugado BSA_DA-3 formado se separó del resto de reactivos usando filtros Amicon® Ultra-4 10K. Se llevaron a cabo tres ciclos de 5 minutos a 4800 rpm, usando PB, obteniéndose un volumen final de 2 mL. El conjugado BSA DA-3 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 conjugado 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 2 mg/mL con tampón de elución filtrado y se almacenaron a -20 °C. El número medio de moléculas de hapteno DA-3 conjugadas por cada molécula de BSA-alquino, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $m = 18,1$ (ver Tabla 2, entrada 10).

2.3.2.3. Preparación del conjugado del hapteno DA-3 con OVA [conjugado OVA_DA-3].



El conjugado OVA_DA-3 se preparó como se ha descrito en el apartado 2.3.2.2. para el conjugado análogo de BSA, utilizando una disolución del hapteno DA-3 (**22**, 2,0 mg, 5,1 µmol, 3,1 equivalentes de hapteno por residuo de alquino) en DMSO (265 µL), una disolución del conjugado OVA-alquino descrita en el apartado 2.3.2.1 (RM = 5, 15 mg, 1,66 µmol de grupos alquino) en PB (18,8 mL), 35 µL de la disolución de THPTA y CuSO₄, y 106 µL de la disolución de ascorbato sódico en agua Milli-Q. El conjugado obtenido tras la purificación se llevó a una concentración final de 1 mg/mL en PB y se almacenó a -20 °C. El número medio de moléculas de hapteno DA-3 conjugadas por cada molécula de OVA-alquino, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $m = 4,2$ (ver Tabla 2, entrada 11).

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

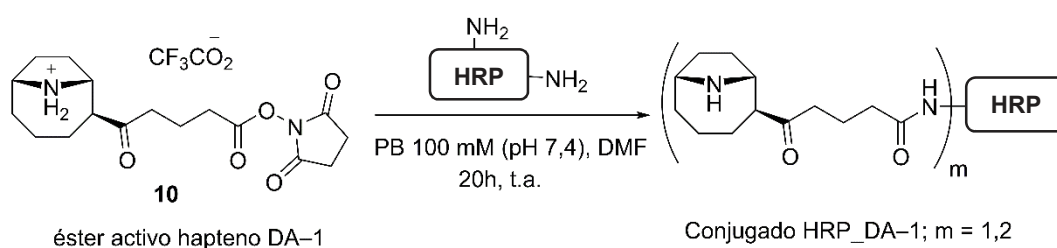
Conjugado	Proteína/Enzima			(alquino)-NHS éster			Equivalentes ^g
	V	C	n	V	C	n	
	(μL) ^a	(mg/mL) ^b	(μmol) ^c	(μL) ^d	(mM) ^e	(μmol) ^f	
1 BSA–alquino	3000	15	0,68	114	150	17,1	25
2 OVA–alquino	3000	15	1,02	67,4	150	10,1	10
3 HRP–alquino	900	4	0,08	54,5	15	0,82	10

^a Volumen utilizado de disolución de proteína o enzima en PB. ^b Concentración de la proteína o enzima en PB. ^c μmol de proteína o enzima utilizados. ^d Volumen utilizado de disolución del (alquino)-NHS éster en DMF. ^e Concentración de (alquino)-NHS éster en DMF. ^f μmol del (alquino)-NHS éster utilizados. ^g Equivalentes de (alquino)-NHS éster utilizados por equivalente de proteína (RM₀).

3. Preparación de conjugados enzimáticos de fórmula (III)

Ejemplo 3.1. Preparación de conjugados de fórmula (III) para **T = R-I**, **L = –CH₂CH₂–**, **Z = –(C=O)NH–** y **Q = HRP**.

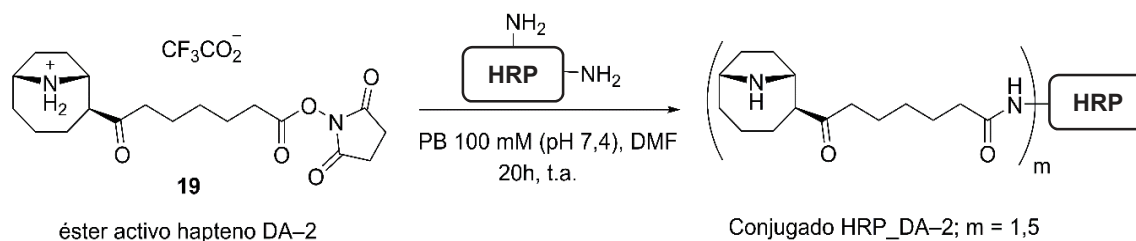
5 3.1.1. Preparación del conjugado del hapteno DA–1 con HRP [conjugado HRP_DA–1].



El conjugado HRP_DA–1 se preparó como se ha descrito anteriormente para el conjugado BSA_DA–1 (apartado 2.1.2.1) a partir de 140 μL de una disolución 5 mM del éster activo del hapteno DA–1 (**10**) en DMF y 1 mL de una disolución de HRP (3 mg/mL) en PB. Tras la purificación cromatográfica, las fracciones obtenidas conteniendo el trazador se llevaron a concentración de 228 μg/mL por dilución con el estabilizante Biostab y se almacenaron a 4 °C. El número medio de moléculas de hapteno DA–1 conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de m = 1,2 (ver Tabla 2, entrada 5).

Ejemplo 3.2. Preparación de conjugados de fórmula (III) para $T = R-I$, $L = -CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $Z = -(C=O)NH-$ y $Q = HRP$.

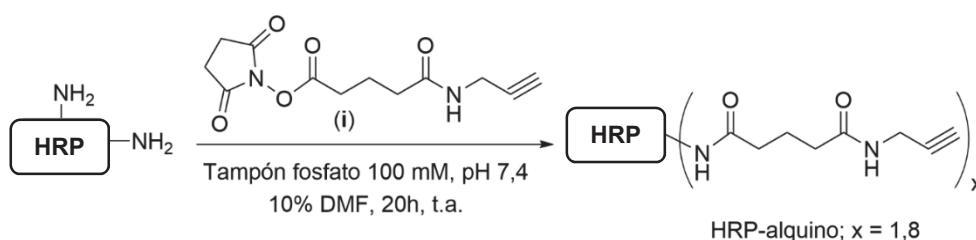
3.1.2. Preparación del conjugado del hapteno DA-2 con HRP [conjugado HRP_DA-2].



- 5 El conjugado HRP_DA-2 se preparó como se ha descrito anteriormente para el conjugado BSA_DA-1 (apartado 2.1.2.1) a partir de 100 μ L de una disolución 5 mM del éster activo del hapteno DA-2 (**19**) en DMF y 900 μ L de una disolución de HRP (3 mg/mL) en PB. Tras la purificación cromatográfica, las fracciones obtenidas conteniendo el trazador se llevaron a concentración de 180 μ g/mL por dilución con el estabilizante
- 10 Biostab y se almacenaron a 4 °C. El número medio de moléculas de hapteno DA-2 conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $m = 1,5$ (ver Tabla 2, entrada 6).

Ejemplo 3.3. Preparación de conjugados de fórmula (III) para $T = R-I$, $L = -CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $Z = -CH_2-N=N-$ y $Q = HRP$.

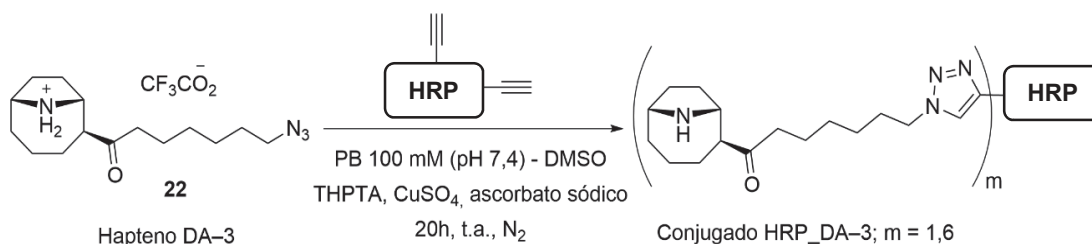
- 15 **3.3.1.** Funcionalización de los grupos amino libres de la enzima HRP con grupos alquínico. [Preparación del conjugado HRP-alquino]



- Los grupos amino libres de la enzima HRP se derivatizaron con grupos alquínico 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 2.1.2, 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
- 20

molecular usando una columna de desalinización Sephadex G-25 HiTrap® de 5 mL y PB como eluyente, a un flujo de 5 mL/minuto y recogiendo fracciones de 1 mL (concentración final obtenida de 1 mg/mL), y se almacenaron a 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 9).

3.3.2. Preparación del conjugado del hapteno DA-3 con HRP [conjugado HRP_DA-3].



El conjugado HRP_DA-3 se preparó como se ha descrito en el apartado 2.3.2.2. para el conjugado análogo de BSA, utilizando una disolución del hapteno DA-3 (**22**, 110 µg, 0,28 µmol, 2,3 equivalentes de hapteno por residuo de alquino) en DMSO (14,1 µL), una disolución del conjugado HRP–alquino descrita en el apartado 3.3.1 (RM = 1,8, 3 mL, 3 mg, 0,12 µmol de grupos de alquino) en PB (33,8 mL), 63 µL de la disolución de THPTA y CuSO₄, y 191 µL de la disolución de ascorbato sódico en agua Milli-Q. El conjugado HRP_DA-3 se purificó por cromatografía de exclusión molecular en 2 columnas de desalinización Sephadex G-25 HiTrap™ de 5 mL acopladas, utilizando como tampón de elución HEPES. El conjugado obtenido tras la purificación se llevó a una concentración de 236 µg/mL por dilución con el estabilizante Biostab y se almaceno a 4 °C. El número medio de moléculas de hapteno DA-3 conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de m = 1,6 (ver Tabla 2, entrada 12).

TABLA 2. Valores carga hapténica de los conjugados proteicos y enzimáticos de los haptenos de dihidroanatoxinas determinados por MALDI-TOF-MS.

	Conjugado	RM_0	<i>equiv</i>	m/z	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/\text{hapteno}$	RM
1	BSA_DA-1	30	-	71454	4673	222	21,0
2	BSA_DA-2	30	-	70303	2322	250	12,9
3	OVA_DA-1	10	-	45567	1181	222	5,3
4	OVA_DA-2	10	-	45308	827	250	3,3
5	HRP_DA-1	10	-	43439	263	222	1,2
6	HRP_DA-2	8	-	43677	386	250	1,5
7	BSA_alquino	25	-	70,098	3017	151	20,0
8	OVA_alquino	10	-	45261	780	151	5,2
9	HRP_alquino	10	-	43562	271	151	1,8
10	BSA_DA-3	80	3,8	74601	5047	278	18,1
11	OVA_DA-3	20	3,2	46295	1180	278	4,2
12	HRP_DA-3	8	2,3	43921	449	278	1,6

RM_0 : equivalentes de alquino o hapteno por molécula de proteína o marcador enzimático utilizados para la conjugación.

***equiv*:** equivalente de hapteno DA-3 utilizado en la conjugación por cada grupo alquino en la proteína o marcador enzimático.

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

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

RM: número medio de moléculas de alquino en las fórmulas de los conjugados de las entradas 7, 8 y 9 de esta tabla; o número medio de moléculas de hapteno en las fórmulas de los conjugados de las entradas 1 a 6 y 10 a 12 de esta tabla.

4. Procedimiento ELISA

- Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada anticuerpo se evaluó mediante
- 5 ELISA competitivo en el formato de anticuerpo inmovilizado mediante anticuerpo de captura con detección directa (formato directo), utilizando en todos los casos como trazador enzimático un derivado marcado de dihidroanatoxina-a de fórmula (IIIb) o (IIIc), en el que **Q** es peroxidasa de rábano picante (HRP), tanto para la evaluación de los anticuerpos generados a partir de los conjugados de fórmula (IIa) como (IIb), en los que
- 10 **P** es seroalbúmina bovina (BSA). Por otro lado, la selección de hibridomas y la especificidad de los anticuerpos se determinó mediante ELISA competitivo en el formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta (formato indirecto) usando conjugados homólogos, es decir, un derivado marcado de dihidroanatoxina-a de fórmula (IIa) o (IIb), en los que **P** es ovoalbúmina (OVA), para la evaluación de los anticuerpos
- 15 generados a partir respectivamente de los conjugados de fórmula (IIa) o (IIb), en los que **P** es seroalbúmina bovina (BSA).

Después de cada etapa de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con una disolución de lavado, usando un lavador de 96 canales ELx405 (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.).

5 Para los ensayos en formato directo, 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 concentraciones en PBST (tampón 10 mM fosfato, pH 7,4, con 140 mM NaCl y 0,05% Tween 20), y se incubó 1 hora 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 (III) donde **Q** es HRP, a diversas concentraciones. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 hora 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 minutos a temperatura ambiente y se paró usando 100 µL por pocillo de ácido sulfúrico 1 M.

20 Para los ensayos en formato indirecto, las placas se tapizaron con 100 µL por pocillo de una disolución de antígeno de ensayo que es un conjugado de fórmula (II), donde **P** es OVA, a diversas concentraciones en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, mediante incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50 µL por pocillo de PBS o estándar analítico en PBS seguido de 50 µL por pocillo de sobrenadante de cultivo o de un determinado anticuerpo diluido en PBST (0,05% Tween 20). La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. A continuación, cada pocillo recibió 100 µL de una dilución 1/2000 de GAM–HRP (anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con peroxidasa) en PBST. Esta reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar las placas, la actividad peroxidasa retenida se reveló como se ha descrito para los ensayos en formato directo.

Al finalizar los ensayos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 450 nm usando una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de microplacas PowerWave HT (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.). Las curvas patrón sigmoideas obtenidas al representar la absorbancia frente al logaritmo de la concentración de analito se ajustaron

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

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

- 5 La especificidad del anticuerpo se estimó como el porcentaje del cociente entre el valor de IC_{50} de dihidrohomoanatoxina-a y el del analito de estudio.

5. Producción de anticuerpos monoclonales

5.1. Inmunización de ratones

- 10 Para la inmunización se emplearon los conjugados de fórmula (IIa) y (IIb), en los que **P** es BSA (conjugados inmunizantes BSA_DA-1 y BSA_DA-2), obtenidos según se describe en los ejemplos anteriores. Se utilizaron hembras de ratón BALB/c, con una edad al inicio del proceso comprendida entre 6 y 8 semanas.

- 15 En cada dosis se administraron por vía intraperitoneal 100 μ g de conjugado por ratón, siendo el volumen total administrado 200 μ L. En la primera inmunización se suministró el conjugado en una emulsión preparada con adyuvante de Freund completo (1:1, v/v). 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 μ g del correspondiente conjugado diluido en PBS.

20 5.2. Fusiones celulares para la obtención de hibridomas

- 25 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 minuto en frío, los linfocitos se lavaron 2 veces con medio completo (con suero) frío y se filtraron para eliminar los coágulos formados.

- 30 La línea de mieloma P3-X63-Ag8.653 fue cultivada los días previos a la fusión en medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) suplementado [2 mM L-alanina-L-glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales, 25 μ g/mL gentamicina, suero bovino fetal

(SBF) 10% (v/v)], manteniendo las células en fase de crecimiento exponencial, de manera que el día de la fusión se 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 minuto), 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 horas 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).

5.3. 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 dihidroanatoxinas 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) o (IIb) en los que **P** es OVA (conjugados de ensayo OVA_DA–1 y OVA_DA–2), 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 dihidroanatoxina-a e inhibición de la señal

igual o superior al 80% en el ensayo en presencia de dihidroanatoxina-a. 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
5 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 dihidroanatoxina-a 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
10 sobrenadante y 50 µL de la disolución de dihidroanatoxina-a 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
15 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
20 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)
25 como agente crioprotector. Los viales se mantuvieron a -80 °C en el interior de una caja de poliestireno durante 24 horas antes de pasarlos al contenedor de nitrógeno líquido.

5.4. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales

En la última fase de la expansión celular de los hibridomas, éstos se dividieron progresivamente en placas de cultivo hasta alcanzarse un volumen final comprendido
30 entre 100 y 200 mL de sobrenadante. Se dejaron crecer las células hasta alcanzar la confluencia, y una vez agotados los nutrientes del medio de cultivo se procedió a recoger el contenido de las placas. El volumen recogido se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se precipitó mediante la adición de un volumen de una disolución saturada de sulfato amónico, manteniéndose a 4 °C hasta su 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 minutos a 5000 rpm (4000×g) y se descartó el sobrenadante. El precipitado que contenía los anticuerpos se redisolvió con
 5 tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,4 y se filtró con membranas de nitrocelulosa (diámetro de poro 0,45 µm) para eliminar partículas en suspensión. La elución del anticuerpo de la columna se realizó con tampón citrato sódico 100 mM, pH 2,5. Las fracciones que contenían el anticuerpo se identificaron mediante espectrofotometría UV y se recogieron. La disolución se neutralizó adicionando Tris-HCl 1 M, pH 9,5.
 10 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 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.

6. Resultados

6.1. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a dihidroanatoxinas

Para demostrar la idoneidad del conjugado de fórmula (II) para la obtención de anticuerpos monoclonales de elevada afinidad hacia dihidroanatoxinas, se inmunizaron
 20 ratones con los conjugados de fórmula (IIa) y (IIb) en los que **P** es BSA (conjugados inmunizantes BSA_DA-1 y BSA_DA-2), y se llevaron a cabo fusiones celulares encaminadas a la generación de hibridomas. Se consiguió obtener 6 líneas celulares (hibridomas) productoras de anticuerpos monoclonales con elevada afinidad hacia dihidroanatoxinas a partir del conjugado de fórmula (IIa) y otras 3 líneas celulares a partir
 25 del conjugado de fórmula (IIb). Los anticuerpos monoclonales producidos a partir de estos hibridomas se han denominado, a efectos de la presente invención y de los ejemplos aquí incluidos, como mAb IIa#17, IIa#22, IIa#23, IIa#122, IIa#129 y IIa#145 [anticuerpos monoclonales obtenidos a partir del conjugado de fórmula (IIa), el conjugado BSA_DA-1], y mAb IIb#116, IIb#130 y IIb#132 (anticuerpos monoclonales
 30 obtenidos a partir del conjugado de fórmula (IIb), el conjugado BSA_DA-2].

6.2. Determinación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales

Una vez purificados por cromatografía de inmunoafinidad los 9 anticuerpos monoclonales obtenidos, se determinó su afinidad hacia dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a mediante ELISA competitivo directo, utilizando como

competidor el trazador enzimático de un derivado marcado de fórmula (IIIb) o (IIIc), en el que Q es HRP (conjugados HRP_DA-2 o HRP_DA-3). Cada anticuerpo monoclonal se ensayó a dos concentraciones (100 y 1000 ng/mL) frente a diferentes concentraciones de trazador (10, 30 y 100 ng/mL). Los valores de IC₅₀ para dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a 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 las curvas de calibración con un menor valor de IC₅₀ para dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, y por tanto una afinidad mayor. En dicho formato de ensayo los mejores anticuerpos mostraron valores de IC₅₀ para dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a por debajo de 1 nM, siendo los anticuerpos de mayor afinidad de entre los producidos hacia ambas dihidroanatoxinas los anticuerpos monoclonales Ila#17 (IC₅₀ = 0,8 nM para dihidroanatoxina-a y IC₅₀ = 0,2 nM para dihidrohomoanatoxina-a) y Ila#145 (IC₅₀ = 0,7 nM para dihidroanatoxina-a y IC₅₀ = 0,4 nM para dihidrohomoanatoxina-a).

TABLA 3. Resultados de los ensayos en formato ELISA competitivo directo utilizando como competidor el trazador enzimático de un derivado marcado de fórmula (IIIb) o fórmula (IIIc) (n = 3).

Anticuerpo Monoclonal ^(a)	IC ₅₀ ^(b)	IC ₅₀ ^(c)	IC ₅₀ ^(c)
	dihidroanatoxina-a (nM)	dihidroanatoxina-a (nM)	dihidrohomoanatoxina-a (nM)
Ila#17	1,8	0,8	0,2
Ila#22	8,6	3,1	0,7
Ila#23	4,4	2,4	1,5
Ila#122	2,8	1,0	0,6
Ila#129	2,9	1,4	0,7
Ila#145	2,6	0,7	0,4
Ilb#116	3,0	1,6	0,5
Ilb#130	5,8	3,2	0,8
Ilb#132	6,4	2,9	1,1

^(a) Los anticuerpos monoclonales (mAbs) denominados como Ila#x se obtuvieron a partir de la inmunización con el conjugado inmunizante BSA_DA-1, mientras que los mAbs denominados como Ilb#x se obtuvieron a partir de la inmunización con el conjugado inmunizante BSA_DA-2. ^(b) Ensayos realizados utilizando como competidor el trazador enzimático HRP_DA-3. ^(c) Ensayos realizados utilizando como competidor el trazador enzimático HRP_DA-2.

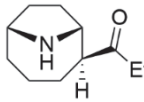
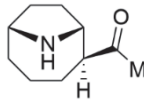
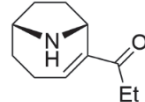
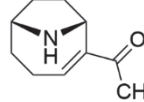
Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto que los conjugados de fórmula (II) objeto de esta invención son aptos para obtener anticuerpos monoclonales de muy elevada afinidad frente a dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a. Además, estos resultados ponen de manifiesto que los conjugados de fórmula (III) objeto de esta invención son muy adecuados para su implementación en diferentes plataformas

inmunoanalíticas que permitan la determinación o cuantificación de dihidroanatoxinas a los niveles de sensibilidad más exigentes.

6.3. Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales

La mayoría de los anticuerpos son altamente específicos de dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a. Al comparar los valores de IC_{50} obtenidos para dihidroanatoxina-a y dihidrohomoanatoxina-a, mediante ELISA competitivo en formato indirecto con conjugado homólogo – es decir, el derivado marcado de fórmula (IIa) o (IIb), en los que **P** es OVA (conjugados OVA_DA-1 y OVA_DA-2), para la evaluación de los anticuerpos generados a partir respectivamente de los conjugados de fórmula (IIa) o (IIb), en los que **P** es BSA (conjugados BSA_DA-1 y BSA_DA-2) – se obtuvieron valores de reactividad cruzada elevados, incluso en algunos cercanos al 100% como con el anticuerpo IIa#23. En cambio, la reactividad cruzada con anatoxina-a y homoanatoxina-a fue generalmente inferior al 10%, excepto con los anticuerpos IIa#22 y IIb#116. Este resultado pone de nuevo de manifiesto que los conjugados de fórmula (II) objeto de esta invención son aptos para obtener anticuerpos monoclonales específicos de dihidroanatoxinas.

Tabla 4. Reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales mediante ELISA competitivo en formato indirecto con conjugado homólogo.^(a)

mAb	Analitos ^(b)			
	DHAN	DAN	HAN	AN
				
	RC (%) ^(c)	RC (%)	RC (%)	RC (%)
IIa#17	100	19,5	3,9	1,2
IIa#22	100	24,0	26,8	7,0
IIa#23	100	96,6	8,2	5,5
IIa#122	100	33,4	7,5	3,0
IIa#129	100	65,7	3,4	1,5
IIa#145	100	40,2	5,5	2,5
IIb#116	100	46,6	11,3	6,2
IIb#130	100	32,4	3,2	0,7
IIb#132	100	50,2	5,4	1,9

^(a) Los valores de IC_{50} son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0,8 y 1,5. ^(b) DHAN: dihidrohomoanatoxina-a; DAN: dihidroanatoxina-a; AN: anatoxina-a; HAN: homoanatoxina-a. ^(c) RC = $(IC_{50} \text{ dihidrohomoanatoxina-a} / IC_{50} \text{ analito}) \times 100$.

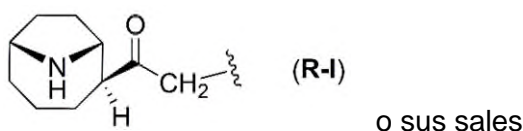
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



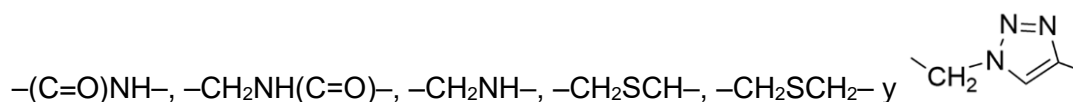
donde

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



L es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 10 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

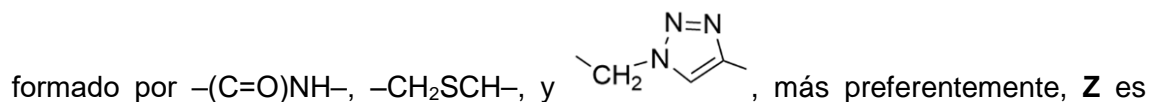
P es un péptido o polipéptido de naturaleza no enzimática, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 Dalton y

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 1 a 5 átomos de carbono.

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

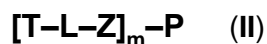


- 20 $-(C=O)NH-$.

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

5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que **m** tiene un valor entre 1 y 25.

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

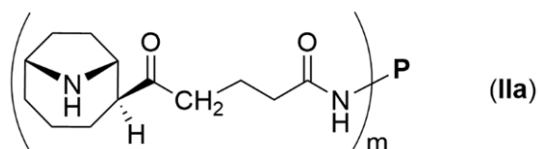


donde

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

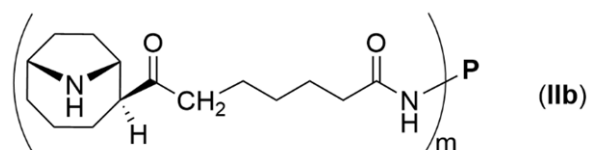
7. Un compuesto según la reivindicación 6, en el que **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina, preferiblemente, **P** es albúmina, más preferiblemente albúmina de huevo o albúmina sérica.

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



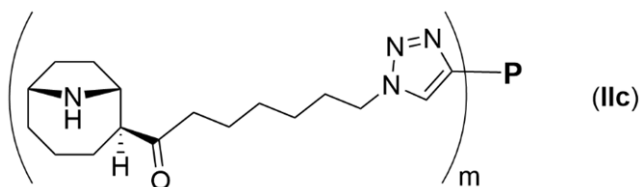
donde **P** y **m** son como se han definido en la reivindicación 6 ó 7.

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



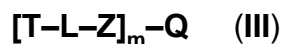
donde **P** y **m** son como se han definido en la reivindicación 6 ó 7.

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



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

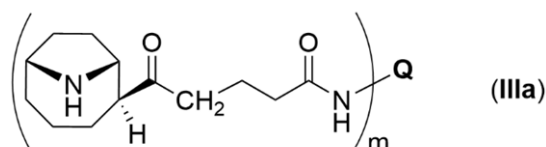
11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, que es un derivado marcado de fórmula (III)



5 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.

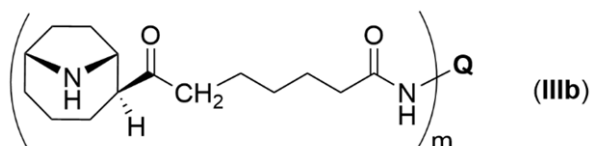
12. Un compuesto según la reivindicación anterior, en el que **Q** está seleccionado entre una molécula química detectora, marcadora o trazadora no isotópica, preferentemente está seleccionado entre: una enzima, biotina, un compuesto luminiscente, un fluoróforo, preferentemente, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta, más 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.

15 13. Un compuesto según la reivindicación 11 ó 12, de fórmula (IIIa)



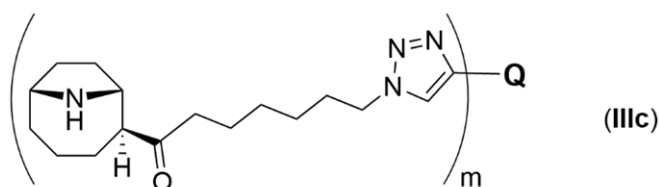
donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, fosfatasa, oxidasa, biotina, fluoresceína y nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

20 14. Un compuesto según la reivindicación 11 ó 12, de fórmula (IIIb)



donde **Q** y **m** son como se han definido en la reivindicación 13.

15. Un compuesto según la reivindicación 11 ó 12, de fórmula (IIIc)



donde **Q** y **m** son como se han definido en la reivindicación 13.

16. Un anticuerpo obtenido mediante la utilización de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

5 17. Un anticuerpo que reconoce el compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

18. El anticuerpo según la reivindicación 16 ó 17, donde el anticuerpo se selecciona entre monoclonal, policlonal y recombinante.

19. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 16 a 18 que
10 reconoce dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a.

20. Uso de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la obtención de un anticuerpo.

21. Uso de un anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, que comprende poner en contacto una muestra que contiene dihidroanatoxina-a y/o
15 dihidrohomoanatoxina-a con dicho anticuerpo para el análisis *in vitro* de dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a.

22. Uso según la reivindicación 21 que comprende:

- a) poner en contacto una muestra con el anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19;
- 20 b) incubar la muestra y el anticuerpo de la etapa (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica; y
- c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).

23. Uso de un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) definido en una cualquiera de las
25 reivindicaciones 1 a 15 para el análisis *in vitro* de dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a.

24. Uso según la reivindicación 23 que comprende:

- a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo anti-dihidroanatoxina-a y/o anti-dihidrohomoanatoxina-a con el compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 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).

25. Uso según la reivindicación 24, 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 15.

26. Uso del anticuerpo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 para la purificación y/o concentración de dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a de una muestra.

27. Uso según la reivindicación 26 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 16 a 19 sobre un soporte;
- b) hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que retenga la dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a presente en dicha muestra; y
- c) eluir la dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a retenida en el soporte.

28. Kit de detección y/o determinación de dihidroanatoxina-a y/o dihidrohomoanatoxina-a que comprende al menos un anticuerpo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

29. El Kit según la reivindicación anterior que comprende un compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

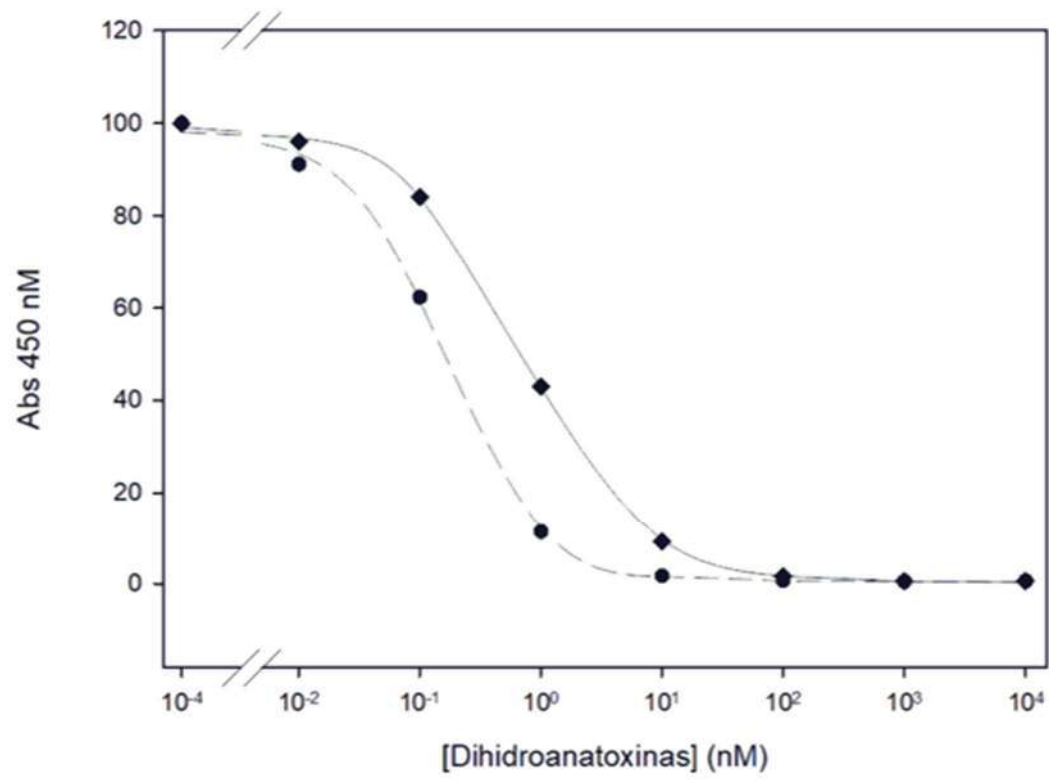


FIGURA 1



21 N.º solicitud: 202430536
22 Fecha de presentación de la solicitud: 27.06.2024
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GUILLERMO QUIÑONES- REYES et al. "Synthetic Haptens and Enantioselective Monoclonal Antibodies to the Cyanotoxin Anatoxin-a". Angewandte Chemie International Edition. John Wiley & Sons, Inc., 27/05/2019, Vol. 58, Páginas 9134-9139, ISSN 1433-7851, ISSN 1521-3773 (electronic), <DOI: 10.1002/anie.201904002>. resumen; figura 1; páginas 9134-9139.	16-18
X	ES 2612751 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIG CIENTÍFICAS (CSIC) et al.) 18/05/2017, reivindicaciones 1-20; ejemplo 3.	16-18
A	BEACH DANIEL G et al. "Rapid Quantitation of Anatoxins in Benthic Cyanobacterial Mats Using Direct Analysis in Real-Time-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry". Environmental science & technology. 20/09/2022, Vol. 56, Páginas 13837-13844, ISSN 1520-5851 (electronic), <DOI: 10.1021/acs.est.2c05426>. Ver resumen; experimental; figura 1.	1-29
<div>Categoría de los documentos citados</div> <div>X: de particular relevancia</div> <div>Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría</div> <div>A: refleja el estado de la técnica</div> <div>O: referido a divulgación no escrita</div> <div>P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud</div> <div>E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</div>		
<div>El presente informe ha sido realizado</div> <div><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones</div> <div><input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</div>		
Fecha de realización del informe 27.05.2025	Examinador N. Martín Laso	Página 1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D451/00 (2006.01)
G01N33/531 (2006.01)
G01N33/533 (2006.01)
C07K16/00 (2006.01)

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

C07D, G01N, C07K

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

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, INVENES/LATIPAT, CAS