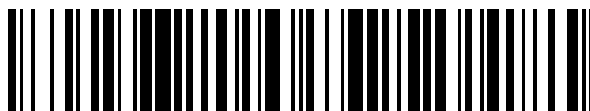


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 364**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2009 PCT/US2009/002342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10039163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09801832 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2276510**

54 Título: **Aductos químicos y bioquímicos como biomarcadores para exposición a organofosfatos**

30 Prioridad:

**14.04.2008 US 124198 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.01.2017**

73 Titular/es:

**HUMAN BIOMOLECULAR RESEARCH INSTITUTE  
(100.0%)  
5310 Eastgate Mall  
San Diego, CA 92121-2804, US**

72 Inventor/es:

**CASHMAN, JOHN, R. y  
MACDONALD, MARY, T.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 596 364 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Aductos químicos y bioquímicos como biomarcadores para exposición a organofosfatos

## DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DEL GOBIERNO

5 La invención fue apoyada, al menos en parte, por una concesión del Gobierno de los Estados Unidos de América (concesión U01 NS058038 del National Institutes of Health (NIH)). El Gobierno tiene ciertos derechos con respecto a la invención.

## CAMPO

10 La presente invención se refiere al campo de diagnóstico, particularmente en el área de exposición a compuestos de organofosfatos que inhiben esterasas y otras enzimas y se unen a proteínas séricas y a otras proteínas, y a la identificación de biomarcadores.

## ANTECEDENTES

15 Cambios recientes en la situación de seguridad a la que se enfrentan los ciudadanos de los Estados Unidos de América y el personal militar en el extranjero han incrementado enormemente la amenaza de que se usarán armas químicas contra las fuerzas americanas y civiles americanos en el campo de batalla así como también en casa. La información actual indica que los bioterroristas han contemplado el uso de agentes nerviosos de organofosfato (OP). Los gases nerviosos de OP son una amenaza para el personal militar y para los civiles (por ejemplo, exposición de los militares en la Guerra del Golfo, y exposición de los civiles en el sistema de metro de Tokio). Además, los granjeros, trabajadores agrícolas y el personal que aplica plaguicidas manejan grandes cantidades de OPs y están potencialmente expuestos a estos materiales tóxicos. En los Estados Unidos de América, anualmente se dan a conocer entre 150.000 y 300.000 episodios tóxicos relacionadas con OP (Rosenstock, Keifer et al. 1991). Esta situación apunta a una necesidad urgente de una forma eficiente, adaptable al terreno y barata para detectar agentes nerviosos de OP. Un tratamiento disponible de envenenamiento agudo por agentes nerviosos de OP solamente actúa de una manera competitiva, y no es adecuado puesto que no evita el daño cerebral neuronal ni la incapacitación. La instrumentación de detección es un componente esencial de cualquier paradigma de protección, y de este modo un reto es desarrollar la metodología de descontaminación y detección para diversos agentes de OP (Chen y Mulchandani 1998; Sogorb y Vilanova 2002).

20 Los agentes nerviosos de OP actúan inhibiendo la familia de enzimas de colinesterasas (ChE), mayoritariamente en el cerebro, en el sistema nervioso central y en la sangre. Dentro de la familia de colinesterasas, la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE) son las dianas mejor conocidas. En el caso de AChE, el aducto de OP resultante inactiva la enzima, permite que la acetilcolina (ACh) se acumule en la sinapsis, estimule receptores autonómicos, y bloqueen receptores de unión neuromuscular. Los síntomas resultantes de la exposición a agentes nerviosos son principalmente la consecuencia de acumulación de ACh en exceso en las uniones nerviosas en las que normalmente se necesitan cantidades pequeñas de ACh para la transmisión del impulso. Los síntomas no colinérgicos se han relacionado con exposición a OP, incluyendo neuropatía retrasada, leucemia, depresión, genotoxicidad, toxicidad pulmonar y pérdida de visión. Se han mostrado pruebas para dianas no AChE con ratones genosuprimidos para AChE (Xie, Stribley et al. 2000; Duysen, Li et al. 2001).

30 Otras proteínas también forman aductos con los OPs. Estas proteínas incluyen, pero no se limitan a, albúmina sérica, transferrina, tubulina, carboxilesterasa, acilpéptido hidrolasa, amida de ácido graso hidrolasa, el receptor CB1 de cannabinoides, ácido graso sintasa, dipeptidil peptidasa 9, prolil oligopeptidasa, acil de cadena larga coenzima A tioesterasa, PAF acetil-hidrolasa 1b, y esterasa D/S-formil glutationa hidrolasa (Tuin et al.. Chem Res Toxicol. 2009). Los efectos biológicos de la formación del aducto con estas otras proteínas no están completamente comprendidos.

35 Una enzima importante para la hidrólisis periférica de ésteres (y ésteres de OP) en seres humanos es butirilcolinesterasa (BuChE), también conocida como colinesterasa del suero. BuChE es una glucoproteína de 4 subunidades idénticas (Lockridge et al., 1987). Al igual que la estructura tridimensional de AChE de *Torpedo californica*, el sitio activo de BuChE contiene una tríada catalítica tradicional Ser<sup>198</sup>-Glu<sup>325</sup>-His<sup>338</sup>, y se cree que el sitio activo de BuChE se encuentra cerca del fondo de un desfiladero profundo y estrecho. La enzima es de importancia toxicológica y farmacológica, y se piensa que tiene un papel en la protección frente a venenos que se ingieren o se inhalan (Jbilo et al., 1994; Neville et al., 1990). BuChE depura dosis bajas de plaguicidas de OP y de carbamato formando enlaces covalentes con estos agentes a través del sitio activo serínico, y por lo tanto protege a los seres humanos del efecto tóxico de estos venenos (Lockridge y Masson, 2000). En el Esquema 1 se ilustra la interacción inicial y las reacciones subsiguientes de múltiples etapas entre OPs y ChE (Masson, Fortier et al. 1997). Cuando un agente nervioso de OP reacciona con AChE o BuChE, son posibles varios aductos de OP, y la velocidad de modificación covalente (o desalquilación) frente a la recuperación, o del envejecimiento frente a la reactivación, desempeña un papel importante en la potencia y duración de la toxicidad (en el caso de AChE). Los OPs más reactivos contienen un dialcoxi fosfato o fosfonato, y un buen grupo saliente X. El grupo saliente es generalmente un halógeno, mercaptano (éster de tiol), derivado de fenoxi, u otro. Los alcoxi fosfonatos sarín y somán reaccionan con colinesterasa para producir aductos de fosfono-colinesterasa tras la pérdida de F<sup>-</sup>. Igualmente, VX forma un aducto de fosfono-colinesterasa. Algunas colinesterasas modificadas con OP son propensas a la no reactivación, al

envejecimiento y a otros mecanismos post-inhibidores. Esto es importante en ciertas exposiciones a gases nerviosos, por cuanto el “envejecimiento” es un final determinante del mecanismo de la inhibición de colinesterasa.

Los insecticidas de OP se asemejan mucho a los agentes nerviosos de OP, excepto que habitualmente tienen un enlace P=S en lugar de un enlace P=O. Los insecticidas de OP requieren generalmente desulfuración oxidativa hasta el compuesto de P=O para mostrar toxicidad máxima, pero después la interacción química con AchE es la misma. Se sabe que la sustitución del resto P=O por P=S reduce generalmente la reactividad del OP (aunque la oxidación biológica hasta el compuesto de P=O restaura la reactividad). Cuando grupos etoxi o metoxi potencialmente reactivos se sustituyen por sus análogos alquílicos correspondientes (*es decir*, propilo o etilo, respectivamente), también disminuye la toxicidad potencial de los compuestos resultantes. De este modo, los restos de serina fosforilados de AchE y BuChE son moléculas muy ricas en información e indican el tipo y cantidad de exposición a OP, tanto si es de un agente nervioso o un plaguicida. Es necesario un método de detección que pueda identificar el agente (o agentes) de OP preciso y la exposición, de manera que se pueda llevar a cabo el tratamiento y la respuesta apropiados.

La seroalbúmina humana (hSA) constituye el 50-60% de las proteínas del suero. hSA posee actividad de esterasa y de amidasa. También se ha mostrado que hSA tiene la capacidad para unirse a agentes de OP. La unión de OPs a hSA se produce en la tirosina 411. Tal propiedad hace a la hSA un biomarcador potencial para la detección de la exposición a reactivos de OP.

Los anticuerpos provocados frente a los aductos de OP de los miembros de ChE y frente a hSA u otras enzimas o proteínas de unión se pueden usar para determinar una exposición a OP. Los OPs individuales forman aductos específicos para ese reactivo. Por lo tanto, los anticuerpos contra cada proteína que forma aducto con OP proporcionan información importante a la hora de determinar la exposición a un OP particular. Este conocimiento puede conducir a un tratamiento más rápido y a menores efectos adversos de salud a largo plazo.

D. NOORT, A. FIDDER, M. J. VAN DER SCHANS, A. G. HULST: “Verification of Exposure to Organophosphates: Generic Mass Spectrometric Method for Detection of Human Butyrylcholinesterase Adducts” ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 78, nº 18, 15 de septiembre de 2006, páginas 6640-6644, describen un método de espectrometría de masas genérico para verificar la exposición a organofosforados, basado en la conversión química de los péptidos fosforilados, obtenidos tras digestión con pepsina de butirilcolinesterasa humana (HuBuChE), a un péptido precursor común. Tras la exposición del plasma a diversos organofosforados (agentes nerviosos, plaguicidas), HuBuChE se aísla del plasma mediante extracción en fase sólida basada en la afinidad con procainamida. Tras la digestión subsiguiente con pepsina, se pueden identificar en las digestiones los nonapéptidos fosforilados respectivos. Tras el tratamiento de las digestiones de pepsina con Ba(OH)<sub>2</sub> en presencia de una etiqueta nucleófila (un tiol o amina), los nonapéptidos fosforilados se transformaron en un nonapéptido etiquetado común que se pudo analizar sensiblemente por medio de MS en tándem con LC. En la Figura 5 se describe un péptido de secuencia FGE(fosfoserina)AGAAS, que deriva de butirilcolinesterasa humana.

LIANG Y ET AL: “Synthesis of three haptens for the class-specific immunoassay of O,O-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity” ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 615, nº 2, 3 de abril de 2008 (03-04-2008), páginas 174-183, describen un ensayo inmunosorbente ligado a enzima específico de la clase general y amplio, que se desarrolló para los plaguicidas de O,O-dimetil organofósforo, incluyendo malatión, dimetoato, fentoato, fosmet, metidatión, fenitrotión, metil paratión y fentión. Se sintetizaron tres haptenos con diferentes brazos espaciadores. Los haptenos se conjugaron a seroalbúmina bovina (BSA) para inmunógenos, y a ovoalbúmina (OVA) para antígenos de revestimiento.

## SUMARIO

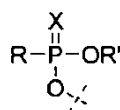
En una realización, se describen compuestos de la siguiente Fórmula I



y sales de los mismos,

en la que:

OP es



seleccionado del grupo que consiste en reactivos de organofósforo reactivos, agentes nerviosos y plaguicidas; la estereoquímica en el fósforo puede ser estereoisómeros  $S_p$  y  $R_p$ , o una mezcla de estereoisómeros  $S_p$  y  $R_p$ ;

5 R es alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, alquilidenilo, alquilidenilo sustituido, alquenilidenilo, alquenilidenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, amino, amino sustituido, alquilamino, acilamino, trifluorometilo, trifluorometoxi, ciano, metilo, etilo, isopropilo, n-propilo, n-butilo, terc-butilo, ciclohexilo, pinacolilo, metoxi, etoxi, propoxi, o dimetilamino;

10 R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alquilidenilo, alquilidenilo sustituido, alquenilidenilo, alquenilidenilo sustituido, haloalquilo, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, trifluorometilo, metilo, etilo, isopropilo, pinacolilo, y ciclohexilo;

X es oxígeno, azufre, selenio o imino;

15 Péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene serina, treonina o tirosina, a la que se une un OP. En una realización, Péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene serina, treonina o tirosina derivada de proteínas modificadas mediante un agente nervioso de OP. En otra realización, Péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene serina, treonina o tirosina derivada de proteínas modificadas mediante un plaguicida. En una realización, Péptido imita el sitio activo de AChE o BuChE. En otra realización, Péptido imita el sitio activo de proteína que contiene serina o treonina, a la que se une un OP. En una realización, Péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene una tirosina a la que se une un OP. En otra realización, Péptido imita la región alrededor de tirosina 411 de seroalbúmina humana. En todavía otra realización, Péptido imita el sitio activo de una proteína que contiene tirosina, en la que se une un OP. En una realización, el número total de aminoácidos que constituye el Péptido está entre 7 y 41;

Enlazador es un aminoácido u otro grupo bifuncional capaz de enlazar covalentemente OP-Péptido a la CP. En una realización, el enlazador es ácido aminocaproico. En otra realización, el enlazador es cisteína; y

25 CP es una proteína conjugada usada para presentar haptenos para la generación de anticuerpos. En una realización, CP es hemocianina de lapa californiana (KLH). En otra realización, CP es seroalbúmina bovina (BSA).

En una realización, se proporciona un método para generar anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para un OP-Péptido, comprendiendo el método:

30 el uso de compuestos de Fórmula (I) como inmunógenos para la generación de anticuerpos, en el que dicho compuesto se inyecta en conejos, ratones o cabras según protocolos estándar para provocar la producción de anticuerpos, con la condición de que el uso no es un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

35 En una realización, se proporciona el uso de anticuerpos frente a los compuestos de Fórmula (I), obteniéndose los anticuerpos mediante el método anterior, para determinar la presencia, identidad y cantidad de aductos de OP en fluidos biológicos a fin de determinar la exposición a agentes nerviosos, plaguicidas, u otros agentes de OP activos que se sabe que modifican covalentemente proteínas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 En una realización, se proporciona una estrategia de biología química para la identificación de aductos químicos que se forman cuando los seres humanos o animales pequeños entran en contacto con reactivos de OP. Se describen aquí aductos fosforilados de serina y tirosina que imitan los aductos de serina y tirosina cuando están en contacto con reactivos de OP. Aunque no limitante, la tecnología también es aplicable a aductos fosforilados. Estos compuestos se usan en la construcción de los compuestos de Fórmula I.

#### DEFINICIONES

45 El término OP se refiere a reactivo de organofósforo reactivo. El término aducto de OP se refiere al producto covalente formado cuando un aminoácido o un péptido o una proteína se tratan con o se mezclan con un reactivo de OP. El término conjugado se refiere al producto de unir el péptido a la proteína portadora.

50 Un diastereómero o enantiómero de un compuesto descrito aquí puede presentar actividad biológica superior en comparación con el otro. Cuando se requiera, la separación de los diastereómeros o enantiómeros se puede lograr usando un auxiliar quiral unido al centro de fósforo, separación mediante métodos cromatográficos, seguido de eliminación del auxiliar. Como alternativa, los diastereómeros o enantiómeros se pueden separar mediante cromatografía usando una fase estacionaria quiral. Aunque no se especifica la quiralidad de la molécula, la tecnología es aplicable a centros de quiralidad con cualquier estereoquímica.

Los valores específicos enumerados más abajo para radicales, sustituyentes e intervalos son solamente para fines ilustrativos; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de intervalos definidos para los radicales y sustituyentes.

5 “Sustituido” pretende indicar que uno o más hidrógenos en el átomo indicado en la expresión que usa “sustituido” se sustituye por una selección del grupo o grupos indicados, con la condición de que no se supere la valencia normal del átomo indicado, y de que la sustitución dé como resultado un compuesto estable. Los grupos indicados adecuados incluyen, por ejemplo, alquilo, alqueno, alquilideno, alquenilideno, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tio, alquilitio, alquilsulfino, alquilsulfonilo, ciano,  $NR^X R^Y$  y/o  $COOR^X$ , en los que cada  $R^X$  y  $R^Y$  son independientemente H, alquilo, alqueno, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo. Cuando un sustituyente es el grupo ceto (es decir, =O) o tio (es decir, =S), entonces se sustituyen 2 hidrógenos en el átomo.

15 “Alquilo” se refiere a un hidrocarburo de  $C_1$ - $C_{18}$  que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Ejemplos son metilo ( $Me$ ,  $-CH_3$ ), etilo ( $Et$ ,  $-CH_2CH_3$ ), 1-propilo ( $n-Pr$ ,  $n$ -propilo,  $CH_2CH_2CH_3$ ), 2-propilo ( $i-Pr$ ,  $i$ -propilo,  $-CH(CH_3)_2$ ), 1-butilo ( $n-Bu$ ,  $n$ -butilo,  $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-metil-1-propilo ( $i-Bu$ ,  $i$ -butilo,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-butilo ( $s-Bu$ ,  $s$ -butilo,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 2-metil-2-propilo ( $t-Bu$ ,  $t$ -butilo,  $-C(CH_3)_3$ ), pentilo ( $n$ -pentilo,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-pentilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ), 3-pentilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ), 2-metil-2-butilo ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$ ), 3-metil-2-butilo ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 3-metil-1-butilo ( $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-metil-1-butilo ( $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1-hexilo ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-hexilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-hexilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-metil-2-pentilo ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-metil-2-pentilo ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 4-metil-2-pentilo ( $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ ), 3-metil-3-pentilo ( $-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$ ), 2-metil-3-pentilo ( $-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 2,3-dimetil-2-butilo ( $-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$ ), 3,3-dimetil-2-butilo ( $-CH(CH_3)C(CH_3)_3$ ).

25 El alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alqueno, alquilideno, alquenilideno, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tio, alquilitio, alquilsulfino, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_x R_y$  y/o  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, alqueno, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo. El alquilo puede estar opcionalmente interrumpido con uno o más oxo no peroxídico ( $-O-$ ), tio ( $-S-$ ), carbonilo ( $-C(=O)-$ ), carboxi ( $-C(=O)O-$ ), sulfonilo ( $SO$ ) o sulfóxido ( $SO_2$ ). Adicionalmente, el alquilo puede estar al menos de manera parcial opcionalmente insaturado, proporcionando de ese modo un alqueno.

30 “Alqueno” se refiere a un hidrocarburo de  $C_2$ - $C_{18}$  que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace  $sp^2$  carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: etileno o vinilo ( $-CH=CH_2$ ), alilo ( $-CH_2CH=CH_2$ ), ciclopentenilo ( $-C_5H_7$ ), y 5-hexenilo ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$ ).

35 El alqueno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, alquilideno, alquenilideno, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tio, alquilitio, alquilsulfino, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_x R_y$  y/o  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, alqueno, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo. Adicionalmente, el alqueno puede estar opcionalmente interrumpido con uno o más oxo peroxídico ( $-O-$ ), tio ( $-S-$ ), carbonilo ( $-C(=O)-$ ), carboxi ( $-C(=O)O-$ ), sulfonilo ( $SO$ ) o sulfóxido ( $SO_2$ ).

45 “Alquilideno” se refiere a un hidrocarburo de  $C_1$ - $C_{18}$  que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos son metilideno ( $=CH_2$ ), etilideno ( $=CHCH_3$ ), 1-propilideno ( $=CHCH_2CH_3$ ), 2-propilideno ( $=C(CH_3)_2$ ), 1-butilideno ( $=CHCH_2CH_2CH_3$ ), 2-metil-1-propilideno ( $=CHCH(CH_3)_2$ ), 2-butilideno ( $=C(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1-pentilo ( $=CHCH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-pentilideno ( $=C(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ), 3-pentilideno ( $=C(CH_2CH_3)_2$ ), 3-metil-2-butilideno ( $=C(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 3-metil-1-butilideno ( $=CHCH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-metil-1-butilideno ( $=CHCH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1-hexilideno ( $=CHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-hexilideno ( $=C(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-hexilideno ( $=C(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$ ), 3-metil-2-pentilideno ( $=C(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 4-metil-2-pentilideno ( $=C(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-metil-3-pentilideno ( $=C(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$ ), y 3,3-dimetil-2-butilideno ( $=C(CH_3)C(CH_3)_3$ ).

50 El alquilideno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, alqueno, alquenilideno, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tio, alquilitio, alquilsulfino, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_x R_y$  y/o  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, alqueno, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo. Adicionalmente, el alquilideno puede estar opcionalmente interrumpido con uno o más oxo no peroxídico ( $-O-$ ), tio ( $-S-$ ), carbonilo ( $-C(=O)-$ ), carboxi ( $-C(=O)O-$ ), sulfonilo ( $SO$ ) o sulfóxido ( $SO_2$ ).

55 “Alquenilideno” se refiere a un hidrocarburo de  $C_2$ - $C_2$  que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace  $sp^2$  carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: alilideno ( $=CHCH=CH_2$ ), y 5-hexenilideno ( $=CHCH_2CH_2CH_2CH=CH_2$ ).

5 El alqueniilidenilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, alqueniilo, alquiliidenilo, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanóilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tioxo, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_xR_y$  y/o  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, alqueniilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo. Adicionalmente, el alqueniilidenilo puede estar opcionalmente interrumpido con uno o más oxígeno no peroxídico (-O-), tio (-S-), carbonilo (-C(=O)-), carboxi (-C(=O)O-), sulfonilo (SO) o sulfóxido (SO<sub>2</sub>).

10 “Alquilenilo” se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, saturado, de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicálicos monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de diferentes átomos de carbono de un alcano progenitor. Los radicales alquilenilo típicos incluyen, pero no se limitan a: metileno (-CH<sub>2</sub>-), 1,2-etilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-propilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), y similares.

15 El alquilenilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, alqueniilo, alquiliidenilo, alqueniilidenilo, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanóilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tioxo, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_xR_y$  y/o  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, alqueniilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo. Adicionalmente, el alquilenilo puede estar opcionalmente interrumpido con uno o más oxígeno no peroxídico (-O-), tio (-S-), carbonilo (-C(=O)-), carboxi (-C(=O)O-), sulfonilo (SO) o sulfóxido (SO<sub>2</sub>). Además, el alquilenilo puede estar al menos de manera parcial opcionalmente insaturado, proporcionando de ese modo un alqueniileno.

20

“Alqueniileno” se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, o cíclico, insaturado, de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicálicos monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un alcano progenitor. Los radicales alqueniileno típicos incluyen, pero no se limitan a: 1,2-etileno (-CH=CH-).

25 El alqueniileno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, alqueniilo, alquiliidenilo, alqueniilidenilo, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanóilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tioxo, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_xR_y$  y/o  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, alqueniilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo. Adicionalmente, el alqueniileno puede estar opcionalmente interrumpido con uno o más oxígeno no peroxídico (-O-), tio (-S-), carbonilo (-C(=O)-), carboxi (-C(=O)O-), sulfonilo (SO) o sulfóxido (SO<sub>2</sub>).

30

El término “alquinilo” se refiere a grupos insaturados que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono e incluye grupos de cadena lineal, de cadena ramificada, y cíclicos, todos los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos. Grupos alquinilo adecuados incluyen etinilo, propinilo, butinilo y similares, los cuales pueden estar

35 opcionalmente sustituidos.

El término “alcoxi” se refiere a grupos alquil-O-, en los que alquilo se define aquí. Los grupos alcoxi preferidos incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, *n*-propoxi, *iso*-propoxi, *n*-butoxi, *terc*-butoxi, *sec*-butoxi, *n*-pentoxi, *n*-hexoxi, 1,2-dimetilbutoxi, y similares.

40 El alcoxi puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, alquiliidenilo, alqueniilidenilo, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanóilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tioxo, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_xR_y$  y  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo.

45 El término “arilo” se refiere a un grupo carbocíclico aromático insaturado de 6 a 20 átomos de carbono que tiene un solo anillo (por ejemplo, fenilo) o múltiples anillos condensados (fusionados), en el que al menos un anillo es aromático (por ejemplo, naftilo, dihidrofenantrenilo, fluorenilo, o antrilo). Arilos preferidos incluyen fenilo, naftilo y similares.

50 El arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más alquilo, alqueniilo, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanóilo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tioxo, alquiltio, alquilsulfinilo, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_xR_y$  y  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo.

55 El término “cicloalquilo” se refiere a grupos alquilo cíclicos de 3 a 20 átomos de carbono que tienen un único anillo cíclico o múltiples anillos condensados. Tales grupos cicloalquilo incluyen, a título de ejemplo, estructuras de un solo anillo, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo, y similares, o estructuras de múltiples anillos, tales como adamantanilo, y similares.



El término “alcanoílo” se refiere a  $C(=O)R$ , en el que R es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente.

El término “aciloxi” se refiere a  $-O-C(=O)R$ , en el que R es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente. Ejemplos de grupos aciloxi incluyen, pero no se limitan a, acetoxi, propanoiloxi, butanoiloxi, y pentanoiloxi. Cualquier grupo alquilo como se define anteriormente puede ser usado para formar un grupo aciloxi.

- 5 El término “alcoxicarbonilo” se refiere a  $C(=O)OR$ , en el que R es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente.

El término “amino” se refiere a  $-NH_2$ , y el término “alquilamino” se refiere a  $-NR_2$ , en el que al menos un R es alquilo y el segundo R es alquilo o hidrógeno. El término “acilamino” se refiere a  $RC(=O)N$ , en el que R es alquilo, alquilidenilo, arilo, heteroarilo y similares.

- 10 El término “imino” se refiere a  $-C=N-[H \text{ o } C-]$ .

El término “nitro” se refiere a  $-NO_2$ .

El término “trifluorometilo” se refiere a  $-CF_3$ .

El término “trifluorometoxi” se refiere a  $-OCF_3$ .

El término “ciano” se refiere a  $-CN$ .

- 15 El término “hidroxi” o “hidroxilo” se refiere a  $-OH$ .

El término “oxi” se refiere a  $-O-$ .

El término “tio” se refiere a  $-S-$ .

El término “tioxo” se refiere a  $(=S)$ .

El término “ceto” se refiere a  $(=O)$ .

- 20 El término “tiofosforo” se refiere a  $(P=S)$ .

Como se usa aquí, “base de ácido nucleico” se refiere a una base nitrogenada que es plana, aromática y heterocíclica. Típicamente son derivados de purina o pirimidina. Las bases de ácido nucleico adecuadas incluyen, por ejemplo, purina, pirimidina, adenina, guanina, citosina, uracilo, y timina.

- 25 La base de ácido nucleico puede estar opcionalmente sustituida con uno o más alquilo, alquenoilo, alquilidenilo, alqueniilidenilo, alcoxi, halo, haloalquilo, hidroxi, hidroxialquilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo, alcanoílo, alcoxicarbonilo, amino, imino, alquilamino, acilamino, nitro, trifluorometilo, trifluorometoxi, carboxi, carboxialquilo, ceto, tioxo, alquiltio, alquilsulfino, alquilsulfonilo, ciano,  $NR_xR_y$ , y/o  $COOR_x$ , en los que cada  $R_x$  y  $R_y$  son independientemente H, alquilo, alquenoilo, arilo, heteroarilo, heterociclo, cicloalquilo o hidroxilo.

- 30 Como se usa aquí, “aminoácido” se refiere a un compuesto con una amina y un ácido carboxílico separados mediante un CHR o  $CH_2CHR$  como en los beta-aminoácidos. El descriptor R se refiere a la cadena lateral en el aminoácido.

- 35 La cadena lateral R del aminoácido puede ser cualquiera de los aminoácidos de origen natural en la naturaleza, o cualquiera de los aminoácidos no naturales tales como ornitina. Los ejemplos de grupos de cadena lateral R del aminoácido incluyen, pero no se limitan a, H (glicina),  $CH_3$  (alanina),  $CH_2OH$  (serina),  $CH_2$ -fenil (fenilalanina), y similares. Otras cadenas laterales de aminoácidos son conocidas por el experto en la técnica.

El estereocentro del aminoácido puede ser R o S.

- 40 Como se usa aquí, el término “péptido” se refiere a una secuencia de aminoácidos naturales o no naturales enlazados juntos covalentemente vía enlaces amídicos. Los métodos para obtener péptidos a partir de aminoácidos son conocidos en la técnica, y se incorporan aquí como referencia. Un péptido contiene un mínimo de dos aminoácidos, con un máximo de 100 aminoácidos, preferiblemente 7 a 41 aminoácidos. Algunos péptidos son capaces de formar aductos con OPs. Estos péptidos incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero, transferrina, tubulina, carboxilesterasa, acilpéptido hidrolasa, amida de ácido graso hidrolasa, el receptor CB1 de cannabinoide, ácido graso sintasa, dipeptidil peptidasa 9, prolil oligopeptidasa, acil de cadena larga coenzima A tioesterasa, PAF acetilhidrolasa 1b, y esterasa D/S-formil glutatona hidrolasa.

- 45 Como se usa aquí, el término “enlazador” se refiere a un reactivo bifuncional, que contiene, por ejemplo, un grupo carboxilo y un grupo amina, o un grupo tiol, separados por un número variable de átomos; el enlazador se puede usar para unir covalentemente el péptido a una proteína más grande, a una resina, o a un soporte sólido. Los enlazadores preferidos son beta-alanina, ácido aminopropanoico, ácido aminobutírico, ácido aminopentanoico, ácido aminocaproico, cisteína, homocisteína, y similares.



Como se usa aquí, la expresión “proteína conjugada” se refiere a una proteína a la que se une covalentemente un hapteno con el fin de provocar una respuesta inmunitaria frente al hapteno. Los ejemplos de proteínas conjugadas incluyen, pero no se limitan a, KLH (hemocianina de lapa californiana) y BSA (seroalbúmina bovina), y similares.

5 Como se usa aquí, el término “sal” se refiere a un complejo formado entre una molécula cargada y un contraión adecuado para formar una especie neutra. Los ejemplos de sales para compuestos cargados positivamente incluyen, pero no se limitan a, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, sulfato, nitrato, citrato, bicarbonato, y similares. Los ejemplos de sales para compuestos cargados negativamente incluyen, pero no se limitan a, sodio, potasio, cesio, calcio, magnesio, y similares.

10 La expresión “grupo protector” se refiere a una funcionalidad química diseñada para bloquear temporalmente una porción de una molécula para modificación química durante etapas sintéticas. En “Protective Groups in Organic Synthesis”, 4ª Edición, 2006, por Theodora W. Greene & Peter G. M. Wuts, se puede encontrar una lista amplia de tales grupos protectores. Los ejemplos de grupos protectores para nitrógeno en los aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, carbamatos, carbamatos de etilo sustituido, carbamatos diversos, derivados de tipo urea, amidas, derivados de imida cíclicos, N-alquilaminas, N-arilaminas, derivados de imina, derivados de enamina, derivados de N-heteroátomos, escisión asistida o escisión fotolítica. Los ejemplos de carbamatos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, 9-fluorenilmetilo, 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilo, 17-tetrabenzo[a,c,g,i]fluorenilmetilo, 2-cloro-3-indenilmetilo, benz[*f*]inden-3-ilmetilo, 2,7-di-*t*-butilo [9-(10,10-dioxo-10,10,10,10-tetrahidrotioxantil)metilo, y 1,1-dioxobenzo[*b*]tiofen-2-ilmetilo. Los ejemplos de carbamatos de etilo sustituido incluyen, pero no se limitan a, 2,2,2,-triclouroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-feniletilo, 1-(1-adamantil)-1-metiletilo, 2-cloroetilo, 1,1-dimetil-2-haloetilo, 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo, 1,1-dimetil-2,2,2-triclouroetilo, 1-(3,5-di-*t*-butilfenil)-1-metiletilo, 1-metil-1-(4-bifenil)etilo, *t*-butilo, 1-adamantilo, vinilo, alilo, cinamilo, 1-isopropilalilo, 4-nitrocinaamilo, 3-(3'-piridil)prop-2-enilo, 8-quinolilo, N-hidroxipiperidinilo, alquilditio, y bencilo. Los ejemplos de derivados de tipo urea incluyen, pero no se limitan a, fenotiazinil-(10)-carbonilo, *N*-*p*-toluenosulfonilaminocarbonilo, y *N*-fenilaminotiocarbonilo. Otros grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, *t*-butil-oxicarbonilo (Boc), fluorenilmetil-oxicarbonilo (Fmoc), y benciloxicarbonilo (Cbz).

En cuanto a cualquiera de los grupos anteriores, que contienen uno o más sustituyentes, se entiende que tales grupos no contienen ninguna sustitución o patrones de sustitución que sean estéricamente impracticables y/o sintéticamente no factibles. Además, los compuestos de esta invención incluyen todos los isómeros estereoquímicos que surgen de la sustitución de estos compuestos.

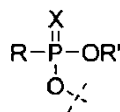
## 30 COMPUESTOS

En una realización, se describen compuestos de la siguiente Fórmula I:



en la que:

OP es



35 seleccionado del grupo que consiste en reactivos de organofósforo reactivos, agentes nerviosos y plaguicidas; la estereoquímica en el fósforo puede ser estereoisómeros  $S_p$  y  $R_p$ , o una mezcla de estereoisómeros  $S_p$  y  $R_p$ ;

40 R es alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo sustituido, alquilidenilo, alquilidenilo sustituido, alquenilidenilo, alquenilidenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, halo, haloalquilo, hidroxil, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, amino, amino sustituido, alquilamino, acilamino, trifluorometilo, trifluorometoxi, ciano, metilo, etilo, isopropilo, *n*-propilo, *n*-butilo, terc-butilo, ciclohexilo, pinacolilo, metoxi, etoxi, propoxi, o dimetilamino;

45 R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, alquilidenilo, alquilidenilo sustituido, alquenilidenilo, alquenilidenilo sustituido, haloalquilo, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, trifluorometilo, metilo, etilo, isopropilo, pinacolilo, y ciclohexilo;

X es oxígeno, azufre, selenio o imino;

50 un péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene serina, treonina o tirosina, a la que se une un OP.

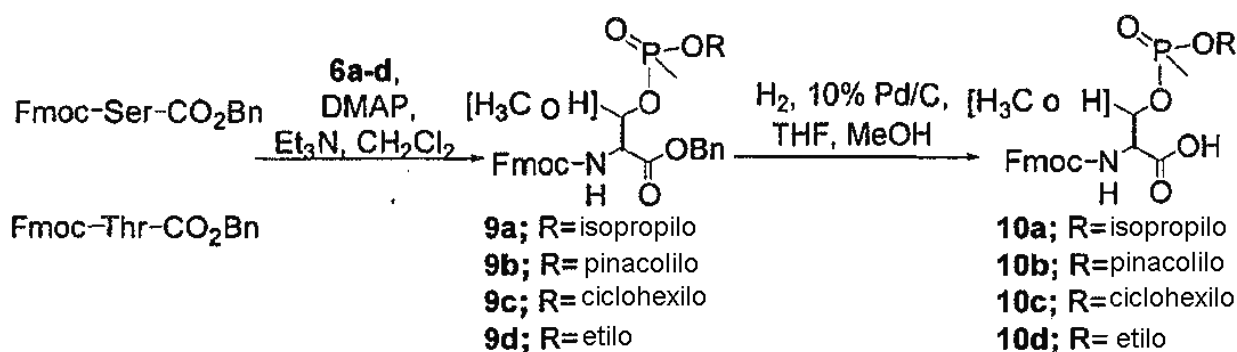
En una realización, un péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene serina, treonina o tirosina derivada de proteínas modificadas mediante un agente nervioso de OP. En otra realización, un péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene serina, treonina o tirosina derivada de proteínas modificadas mediante un plaguicida. En una realización, una secuencia imita el sitio activo de AChE o BuChE. En otra realización, una secuencia imita el sitio activo de proteína que contiene serina o treonina, a la que se une un OP. En una realización, Péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene una tirosina a la que se une un OP. En otra realización, la secuencia imita la región alrededor de tirosina 411 de seroalbúmina humana. En todavía otra realización, la secuencia imita el sitio activo de una proteína que contiene tirosina, en la que se une un OP. En una realización, el número total de aminoácidos que constituye el péptido está entre 7 y 41;

un enlazador es un aminoácido u otro grupo bifuncional capaz de enlazar covalentemente OP-péptido a la CP. En una realización, el enlazador es ácido aminocaproico. En otra realización, el enlazador es cisteína. CP es una proteína conjugada usada para presentar haptenos para la generación de anticuerpos. En una realización, CP es hemocianina de lapa californiana (KLH). En otra realización, CP es seroalbúmina bovina (BSA);

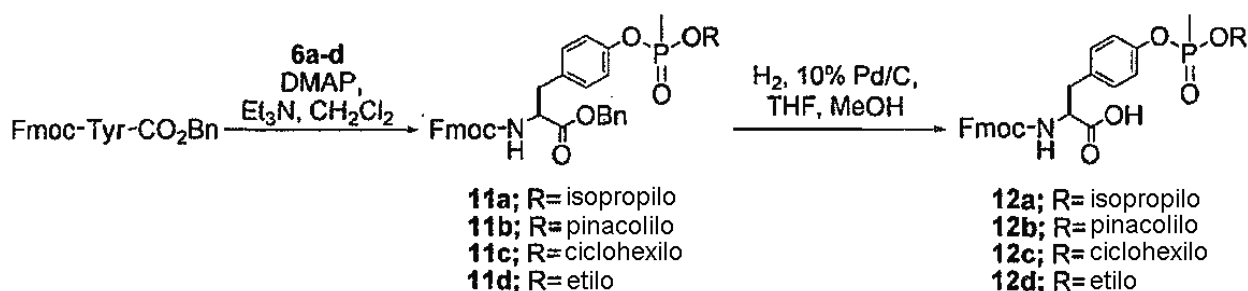
y sales de los mismos.

Los compuestos proporcionados aquí se pueden sintetizar usando técnicas de química orgánica sintética bien conocidas. Los Esquemas 1 y 2 a continuación muestran rutas sintéticas que se usan para sintetizar algunos de los compuestos descritos aquí.

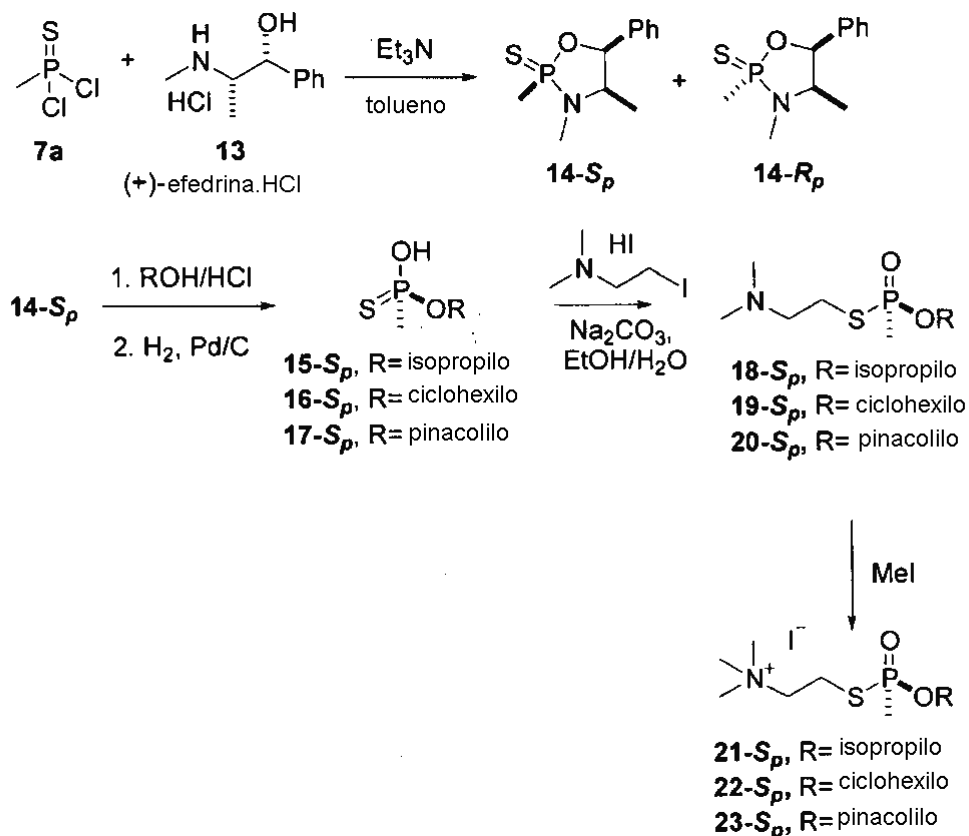
Esquema 1: Síntesis de reactivos de fosfonato de serina y de treonina



Esquema 2: Síntesis de reactivos de fosfonato de tirosina



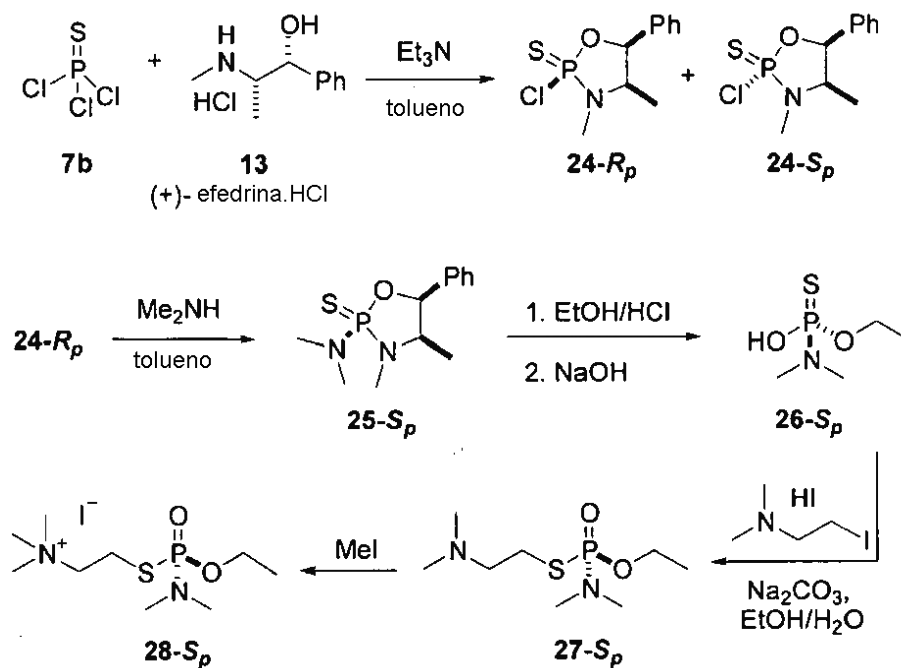
Esquema 3 de Referencia: Síntesis química de análogos  $S_p$  de agentes nerviosos enantioméricamente enriquecidos para GB, GF y GD ( $18-S_p$  a  $23-S_p$ ).



La síntesis de análogos  $R_p$  de agentes nerviosos sigue el mismo esquema usando el intermedio  $14-R_p$  (esquema no mostrado).

Esquema 4 de Referencia: Síntesis química de análogos  $S_p$  de agentes nerviosos enantioméricamente enriquecidos para GA ( $27-S_p$  y  $28-S_p$ ).

5



La síntesis de análogos  $R_p$  de agentes nerviosos sigue el mismo esquema usando el intermedio  $24-S_p$  (esquema no mostrado).

Los compuestos de estructuras **8** y **12** se incorporan en péptidos de secuencias que rodean a la serina reactiva en la familia de Che o a la tirosina reactiva en hSA. En una realización, el péptido tiene no menos de 7 aminoácidos y no más de 41 aminoácidos. En una realización, la síntesis peptídica se puede lograr mediante técnicas en fase sólida. En otra realización, la síntesis peptídica se puede lograr mediante técnicas en fase de disolución.

- 5 Los péptidos resultantes se pueden unir a la CP usando técnicas estándar. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, la formación de enlaces amídicos entre el péptido y las cadenas laterales de amina o de ácido carboxílico de la CP, o a través de la adición de un tiol a una CP modificada para que contenga grupos maleimida reactivos. En una realización, el producto final es un compuesto de Fórmula I.

Más abajo, en la sección de Ejemplos, se describen procedimientos sintéticos adicionales.

## 10 MÉTODOS DE USO

La invención proporciona un método para generar anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para un OP-Péptido, comprendiendo el método:

- el uso de compuestos de Fórmula (I) como inmunógenos para la generación de anticuerpos,  
 en el que dicho compuesto se inyecta en conejos, ratones o cabras según protocolos estándar para provocar  
 15 la producción de anticuerpos,  
 con la condición de que el uso no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Los anticuerpos policlonales aislados reconocen el hapteno original o toda la proteína que representa el hapteno. En una realización, los anticuerpos monoclonales se aíslan usando técnicas de hibridoma.

- 20 Los anticuerpos frente a los compuestos de Fórmula (I), como se obtienen mediante este método, se pueden usar para determinar la presencia, identidad y cantidad de aductos de OP en fluidos biológicos a fin de determinar la exposición a agentes nerviosos, plaguicidas, u otros agentes de OP activos conocidos por modificar covalentemente proteínas.

- 25 Los anticuerpos aislados se usan para identificar ChE u otra esterasa o hSA u otra proteína de unión procedente de muestras humanas o animales que forman aductos con OP. Para la detección, se puede usar una variedad de métodos.

- Se han desarrollado biosensores usando guías de ondas ópticas. El enfoque adoptado se centra en un sistema de biosensores ópticos diseñado especialmente para la detección simultánea de múltiples dianas en múltiples  
 30 muestras. La mayoría de los biosensores ópticos se han desarrollado como sistemas de laboratorio. Los sistemas comercialmente disponibles que se han automatizado parcialmente incluyen el sistema de Biacore SPR, el sistema electroquimioluminiscente ORIGEN, el sistema de espejo resonante IAsys, y el inmunosensor de flujo de desplazamiento IMPACT. Cada uno de éstos es único en su diseño del sistema hidráulico. El Biacore hace fluir la muestra sobre la superficie del sensor en una única pasada a través de un canal de flujo; las medidas se realizan de forma continua, habitualmente hasta que no hay ningún cambio adicional de señal. El ORIGEN procesa muestras  
 35 discretas de forma individual capturando la diana de la disolución en perlas magnéticas, recogéndo las en un imán, añadiendo el sustrato quimioluminiscente, y midiendo la producción de luz. El IAsys agita la muestra en una cubeta de flujo continuo situada sobre el espejo resonante, y mide la señal a medida que se produce la unión. El IMPACT recoge automáticamente saliva y la hace pasar a través de minicolumnas que contienen anticuerpos específicos para sustancias de abuso. En presencia del fármaco, un análogo fluorescente del fármaco se desplaza desde el anticuerpo inmovilizado y se mide aguas abajo. Estos sistemas solamente pueden discriminar múltiples dianas  
 40 enviando la muestra sobre superficies sensoras paralelas; el sistema de Biacore SPR tiene cuatro canales paralelos en la unidad estándar, el sistema de ORIGEN puede tener ocho, el IAsys tiene dos cubetas, y el IMPACT aloja diez columnas de flujo.

- Además de los instrumentos descritos anteriormente para uso de laboratorio, se han comercializado dos sistemas de  
 45 biosensores ópticos, el FAST 6000 y el RAPTOR, para la operación en el terreno. El FAST 6000 es un inmunosensor de flujo de desplazamiento pequeño (3,7 kg) para explosivos, y funciona con los mismos principios que el IMPACT (Kusterbeck, 2002; Shriver-Lake et al., 2003). Tiene aproximadamente el tamaño de un ordenador portátil, y analiza automáticamente una muestra añadida manualmente para hasta seis dianas diferentes con tiempos totales de ensayo por debajo de dos minutos. El biosensor de fibra óptica RAPTOR es portátil (4,6 kg), y  
 50 puede procesar automáticamente muestras añadidas manualmente o bombeadas desde un muestreador de aire controlado por ordenador. El RAPTOR usa cuatro sondas de fibra óptica revestidas con anticuerpos para extraer la diana de las muestras, y genera una señal cuando un anticuerpo trazador fluorescente se une a la diana capturada por las sondas revestidas con los anticuerpos. Toda la operación, incluyendo el análisis y presentación de los datos, está automatizada (Jung et al., 2003). Debido a que usa un fluoroinmunoensayo de sándwich, se ha demostrado que  
 55 es muy resistente a interferencia de componentes de muestras complejas (Anderson y Taitt, 2001; DeMarco et al., 1999; Golden et al., 1997), y la versión actual del dispositivo automatizado está demostrando ser muy fiable (Jung et

al., 2003). La limitación principal del RAPTOR es que analiza una muestra cada vez y generalmente está limitado a la detección de solamente cuatro dianas, aunque recientemente se ha dado a conocer la detección de ocho dianas (Anderson et al., 2004).

En comparación con los sensores descritos anteriormente, un formato de matriz ofrece un número de ventajas, tales como el potencial de analizar simultáneamente una muestra para un gran número de dianas. Además, la inclusión de controles positivos y negativos en cada superficie sensora es más fiable que tales controles situados en superficies sensoras paralelas pero distintas. La tecnología de matrices de ADN ha conducido este esfuerzo en términos de dispositivos de laboratorio y dos sistemas destacados que emplean guías de ondas ópticas incluyen los sistemas comercializados por Zeptosens (Pawlak et al., 2002) e Illumina (Epstein y Walt, 2003). Estos sistemas alojan miles de moléculas de captura y son muy sensibles. Sin embargo, están diseñados para uso mediante personal de laboratorio muy entrenado, y no se han automatizado o adaptado para aplicaciones en el sitio.

Los biosensores se publicitan ampliamente como soluciones para problemas de detección que se pueden usar fuera de laboratorio. Sin embargo, pocos biosensores se han hecho en realidad portátiles y suficientemente automatizados para lograr esta meta. No obstante, aunque los sistemas portátiles han sido lentos para alcanzar el terreno, las capacidades de los biosensores de laboratorio continúan expandiéndose. Como consecuencia, continuamente aumentan las expectativas de los usuarios potenciales. El Array Biosensor descrito aquí combina tecnología de guías de ondas ópticas y la capacidad para ensayar múltiples muestras simultáneamente para múltiples dianas con portabilidad y automatización.

Naval Research Lab (NRL) ha desarrollado un biosensor basado en una guía de ondas plana con un área superficial suficiente para alojar muchas regiones sensoras pequeñas ( $\text{mm}^2$ ). La guía de ondas, un portaobjetos de microscopio modificado, se ilumina usando un láser de diodo de 635 nm y un generador de línea, lanzándose la luz en el extremo proximal. Los primeros dos tercios del portaobjetos proporcionan una región de mezcla de modos, de manera que la luz es relativamente uniforme en la región sensora de  $2,4 \text{ cm}^2$  próxima al extremo distal (Feldstein et al., 1999). En condiciones normales, se logra la reflexión interna total, y se produce un campo evanescente en la región sensora. La luz evanescente excita fluoróforos unidos en la región sensora, y la fluorescencia emitida se mide a  $90^\circ$  usando una cámara CCD enfriada por Peltier (Wadkins et al., 1997; Golden et al., 2003). La localización de la fluorescencia en la matriz en una superficie de guía de ondas revela la identidad de la diana detectada.

A fin de capturar la diana de las muestras, los anticuerpos u otras moléculas capaces de unirse a la diana se inmovilizan sobre la superficie de la guía de ondas en matrices de manchas (Rowe et al., 1999; Delehanty et al., 2002). En las matrices se pueden incluir controles tanto positivos como negativos para prevenir respuestas de falsos positivos o de falsos negativos (Ligler et al., 2003). Además, el uso de múltiples canales en combinación con las matrices de manchas sensoras permite el análisis de múltiples muestras simultáneamente. Los ensayos se pueden formatear para detectar grandes moléculas y microorganismos (ensayos de sándwich) o moléculas pequeños (ensayos competitivos, ensayos de desplazamiento) (Sapsford et al., 2002). El uso de fluorescencia de infrarrojo cercano evita la interferencia de componentes de las muestras, que pueden autofluorescer a longitudes de onda más cortas, haciendo innecesaria la separación de la diana de las muestras complejas antes del análisis (Sapsford et al., 2001; Taitt et al., 2004). En contraste con los sensores sensibles a la masa, tales como la resonancia de plasmones superficiales (SPR), el espejo resonante, o los sistemas interferométricos (Homola et al., 2002; Kinning y Edwards, 2002; Campbell y McCloskey, 2002; Barzen et al., 2002), el Array Biosensor a base de fluorescencia requiere una molécula marcada con fluoróforo para la generación de la señal. Esto hace al ensayo relativamente inmune a la interferencia procedente de la adsorción no específica mediante componentes de las muestras (Ligler et al., 2003; Rowe et al., 1999; Sapsford et al., 2001; Taitt et al., 2004).

La separación de los módulos de depósitos del trazador y de la muestra (1) facilita la liofilización de los reactivos trazadores en el módulo, (2) elimina el potencial de mezclamiento de la muestra y del trazador antes del ensayo (que es importante para prevenir efectos gancho de dosis elevada), y (3) simplifica la sustitución del módulo de la muestra con conexiones a un dispositivo de monitorización continua.

Las aplicaciones potenciales para el uso en el sitio de un Array Biosensor incluyen detección de agentes de riesgo biológico y agentes de riesgo químico, y este es el punto esencial de esta propuesta. La capacidad del Array Biosensor para detectar biomarcadores en muestras complejas con poca o ninguna preparación de las muestras ya se ha demostrado usando un prototipo no automatizado. Los estudios descritos aquí se aplicarán al sistema automatizado para determinar cuán eficazmente el sistema puede detectar biomarcadores relacionados con agentes nerviosos tanto en el marco del laboratorio como en el marco del terreno.

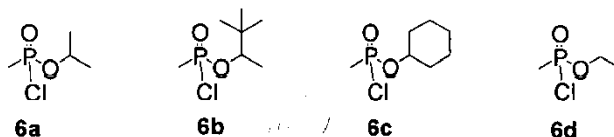
En resumen, usando un enfoque de biología química, se ha identificado un método para detectar selectivamente la exposición a OPs. Esta tecnología proporciona una herramienta valiosa para diagnosticar y verificar el tipo real de exposición a OPs. Esta tecnología tiene el potencial de ayudar a las víctimas de la exposición a OPs a obtener el tratamiento apropiado a tiempo.

La invención se describirá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1. Procedimiento general para fosfonilación**

Una disolución enfriada de monocloruro de **6a-d** mostrado más abajo (4 mmoles) y DMAP (0,4 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 ml) seguido de diisopropiletilamina (4 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se añadió a una disolución de Fmoc-Ser-OBn o Fmoc-Tyr-OBn (1 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 ml), agitando a 0°C en argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en argón. El progreso de la reacción se monitorizó mediante TLC. Cuando pareció que la reacción estaba terminada, se añadió isopropanol a la mezcla antes de eliminar el disolvente a vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc/hexanos) para producir **9a-d** o **11a-d** como una mezcla de diastereómeros. Los datos espectrales reflejan la mezcla diastereomérica.

**10 Ejemplo 2. Éster bencilico de Fmoc-serina (metilfosfonato de O-isopropilo) (9a).**

50% de rendimiento como un aceite; <sup>1</sup>H RMN (500 Mz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,26, 1,30 (d, J=6,2 Hz, 6H), 1,38, 1,41 (d, J=10,1 Hz, 3H), 4,24 (m, 1H), 4,33 (m, 2H), 4,42 (m, 2H), 4,62 (m, 1H), 4,68 (m, 1H), 5,24 (s, 2H), 6,04-6,22 (m, 1H), 7,36 (m, 9H), 7,40 (m, 2H), 7,76 (m, 2H); MS (ESI): m/z 538 (M+1), 560 (M+23).

**Ejemplo 3. Éster bencilico de Fmoc-serina(metilfosfonato de O-pinacolilo) (9b).**

15 86% de rendimiento como un aceite espeso, amarillo; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,89 (s, 9H), 1,27 (d, J=6 Hz, 3H), 1,35 (m, 3H como una mezcla diastereomérica), 4,22, (m, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,40 (m, 2H), 4,61 (m, 2H), 5,22 (s, 2H), 6,04-6,23 (m, 1H como una mezcla diastereomérica), 7,32 (m, 9H), 7,60(m, 2H), 7,75 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,44 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 32,09, 32,77; MS (ESI): m/z 602 (M+23).

**Ejemplo 4. Éster bencilico de Fmoc-serina(metilfosfonato de O-ciclohexilo) (9c).**

20 83% de rendimiento como un residuo espeso, amarillo pálido; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,31 (m, 4H), 1,39 (d, J=18 Hz, 3H), 1,49 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 4,22-4,47 (m, 5H), 4,59 (m, 2H), 5,22 (s, 2H), 6,03-6,21 (m, 1H, mezcla diastereomérica), 7,34 (m, 9H), 7,60 (m, 2H), 7,75 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,44 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 32,13; MS (ESI): m/z 600 (M+23).

**Ejemplo 5. Éster bencilico de Fmoc-serina(metilfosfonato de O-etilo) (9d).**

25 Aceite transparente; 75% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) □ 1,28 (t, J=7 Hz, 3H), 1,41 (d, J=18 Hz, 3H), 4,05 (m, 2H), 4,25 (m, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,42 (m, 2H), 4,48 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 5,24 (s, 2H), 6,11 (m, 1H), 7,37 (m, 9H), 7,62 (m, 2H), 7,78 (d, J=7 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) □ 32,48; MS (ESI): m/z 546 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 6. Éster bencilico de Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-isopropilo) (11a).**

30 Espuma blanca; 66% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,24 (d, J=6 Hz, 3H), 1,34 (d, J=6 Hz, 3H), 1,57 (d, J=18 Hz, 3H), 3,07 (m, 2H), 4,19 (m, 1H), 4,37 (m, 2H), 4,68 (m, 1H), 4,79 (sxt, J=6 Hz, 1H), 5,15 (m, 2H), 5,27 (m, 1H), 6,93 (d, J=6 Hz, 2H), 7,03 (d, J=6 Hz, 2H), 7,35 (m, 9H), 7,56 (d, J=6 Hz, 2H), 7,76 (d, J=6 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27,65; MS (ESI): m/z 636 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 7. Éster bencilico de Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-pinacolilo) (11b).**

35 Aceite transparente; 73% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,89 (s, 9H), 1,29 (d, J=6 Hz, 3H), 1,48 (d, J=15 Hz, 3H), 3,05 (m, 2H), 4,18 (m, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,67 (m, 2H), 5,14 (m, 2H), 5,70 (m, 1H), 6,92 (d, J=6 Hz, 2H), 7,03 (d, J=6 Hz, 2H), 7,30 (m, 9H), 7,52 (d, J=6 Hz, 2H), 7,73 (d, J=6 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27,47, 28,55, 30,34, 33,40; MS (ESI): m/z 678 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 8. Éster bencilico de Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-ciclohexilo) (11c).**

40 Aceite transparente; 85% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,36 (m, 4H), 1,52 (d, J=18 Hz, 3H), 1,61 (m, 2H), 1,83 (m, 2H), 1,94 (m, 2H), 3,08 (m, 2H), 4,39 (m, 1H), 4,43 (m, 2H), 4,52 (m, 1H), 4,69 (m, 1H), 5,17 (m, 2H), 5,28 (d, J=6 Hz, 1H), 6,92 (d, J=6 Hz, 2H), 7,05 (d, J=6 Hz, 2H), 7,36 (m, 9H), 7,55 (d, J=6 Hz, 2H), 7,76 (d, J=6 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27,72, 29,64; MS (ESI): m/z 676 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 9. Éster bencilico de Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-etilo) (11d).**

45 Espuma amarilla; 77% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,3 (t, J=6 Hz, 3H), 1,56 (d, J=18 Hz, 3H), 3,08 (t, J=6 Hz, 2H), 4,2 (m, 2H), 4,38 (m, 2H), 4,68 (m, 1H), 5,14 (m, 2H), 5,36 (d, J=6 Hz, 1H), 6,93 (d, J=9 Hz, 2H), 7,04 (d, J=9 Hz, 2H), 7,35 (m, 9H), 7,56 (d, J=6 Hz, 2H), 7,75 (d, J=6 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28,82; MS (ESI): m/z 624 (M<sup>+</sup>+24).

**Ejemplo 10. Procedimiento general para hidrogenación de ésteres bencílicos.**

Los ésteres bencílicos **9a-d** y **11a-d** (0,25 mmoles) se disolvieron en una mezcla 1:1 de THF/MeOH (8 ml). Se añadió Pd/C (40 mg, 10% en base seca, húmedo, tipo Degussa E101 NEW). La suspensión se vació y se purgó con argón antes de burbujear gas hidrógeno a través de la mezcla a una velocidad moderada. Tras 45 min., el sistema se purgó con argón; la suspensión se filtró a través de un lecho de Celite; y la torta de Celite se lavó extensamente con THF hasta que el ácido libre se extrajo del filtro por lavado cuando se comprobó mediante TLC. El filtrado se concentró a vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (100% de EtOAc, después con CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH 90:8:2) para producir el ácido libre **10a-d** o **12a-d** como una mezcla diastereomérica.

**Ejemplo 11. Fmoc-serina(metilfosfonato de O-isopropilo) (10a).**

77% de rendimiento como una espuma; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,31 (d, J=6 Hz, 6H), 1,51 (d, J=18 Hz, 3H), 4,21 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 4,57 (m, 2H), 4,72 (m, 2H), 6,05-6,21 (m, 1H, mezcla diastereomérica), 7,29 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,59 (in, 2H), 7,75 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,44 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 32,32, 33,08; MS (ESI): m/z 470 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 12. Fmoc-serina(metilfosfonato de O-pinacolilo) (10b).**

47% de rendimiento como una espuma; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,91 (s, 9H), 1,27 (m, 3H), 1,54 (d, J=18 Hz, 3H), 4,22-4,40 (m, 5H), 4,59 (m, 2H), 6,05-6,22 (m, 1H, mezcla diastereomérica), 7,31 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,62 (m, 2H), 7,76 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,44 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 33,01, 33,67; MS (ESI): m/z 512 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 13. Fmoc-serina(metilfosfonato de O-ciclohexilo) (10c).**

72% de rendimiento como un residuo transparente; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,30 (m, 4H), 1,49 (m, 2H), 1,54 (d, J=18 Hz, 3H), 1,69 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 4,22 (m, 2H), 4,35 (m, 3H), 4,57 (m, 2H), 6,02-6,22 (m, 1H, mezcla diastereomérica), 7,29 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,60 (m, 2H), 7,75 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,44 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 32,21, 33,09; MS (ESI): m/z 487 (M<sup>+</sup>), 510 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 14. Fmoc-serina(metilfosfonato de O-etilo) (10d).**

Residuo incoloro; 87% de rendimiento; <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,30 (t, J=7 Hz, 3H), 1,52 (d, J=18 Hz, 3H), 4,09 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 4,37 (m, 2H), 4,58 (m, 2H), 6,15 (d, J=7 Hz, 0,6H), 6,26 (d, J=7 Hz, 0,4H), 7,29 (m, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,6 (m, 2H), 7,76 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 32,69, 33,45; MS (ESI): m/z 456 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 15. Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-isopropilo) (12a).**

Aceite transparente; 85% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,22 (d, J=6 Hz, 3H), 1,32 (d, J=6 Hz, 3H), 1,62 (dd, J=6, 18 Hz, 3H), 3,14 (m, 2H), 4,19 (m, 2H), 4,33 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,8 (m, 1H), 7,10 (m, 4H), 7,3 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,57 (m, 2H), 7,74 (d, J=9 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 28,65; MS (ESI): m/z 546 (M<sup>+</sup>+23)

**Ejemplo 16. Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-pinacolilo) (12b).**

Aceite de color bronce; 62% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,90 (s, 9H), 1,29 (d, J=6 Hz, 3H), 1,45 (d, J=18 Hz, 3H), 3,14 (m, 2H), 4,2 (m, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,66 (m, 2H), 5,39 (m, 1H), 7,09 (s a, 4H), 7,34 (m, 4H), 7,56 (d, J=6 Hz, 2H), 7,75 (d, J=6 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 30,46; MS (ESI): m/z 588 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 17. Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-ciclohexilo) (12c).**

Aceite de color bronce; 0,34 g (60%); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,3 (m, 4H), 1,43-1,53 (m, 2H), 1,63 (d, J=18Hz, 3H), 1,7 (m, 2H), 1,92 (m, 2H), 3,16 (m, 2H), 4,22 (m, 1H), 4,34 (m, 1H), 4,47 (m, 2H), 4,66 (m, 1H), 5,5 (m, 1H), 7,1 (m, 4H), 7,31 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,58 (m, 2H), 7,76 (m, 2H); <sup>31</sup>P RMN (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27,52, 28,12; MS (ESI): m/z 586 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 18. Fmoc-tirosina(metilfosfonato de O-etilo) (12d).**

Espuma blanca; 41% de rendimiento; <sup>1</sup>H RMN(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,29 (t, J=6 Hz, 3H), 1,64 (dd, J=6,18 Hz, 3H), 3,16 (m, 2H), 4,2 (m, 3H), 4,34 (m, 1H), 4,47 (m, 1H), 4,69 (m, 1H), 5,56 (m, 1H), 7,1 (m, 4H), 7,28 (m, 2H), 7,4 (m, 2H), 7,57 (m, 2H), 7,75 (d, J=6 Hz, 2H); <sup>31</sup>P RMN (121,4 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 29,81; MS (ESI): m/z 532 (M<sup>+</sup>+23).

**Ejemplo 19. Síntesis en fase sólida de péptidos fosfonilados**

La síntesis peptídica en fase sólida se realizó usando un sintetizador de péptidos Advanced ChemTech ACT-3926. Los péptidos se sintetizaron usando química de Fmoc en una resina de 2-clorotritilo. Los aminoácidos protegidos usados en la síntesis peptídica incluyeron ácido Fmoc-glutámico con el éster isopropil fenílico en la cadena lateral del ácido carboxílico, y Fmoc-lisina con protección de Fmoc adicional de la cadena lateral de amina. Los

aminoácidos protegidos con Fmoc se activaron con HBTU/HOBt. La síntesis peptídica se realizó en un sintetizador automatizado hasta el resto que precede al aminoácido fosfonilado. Tras este punto en la síntesis, se realizaron manualmente acoplamiento para asegurar la mayor eficiencia de acoplamiento. La escisión de la resina se logró tratando toda la noche a temperatura ambiente el péptido-resina con 1% de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que contiene 2% de triisopropilsilano. Los productos de la reacción peptídica fosfonilados brutos se purificaron mediante HPLC de fase inversa en una columna C18 (0,1% de TFA en agua/acetonitrilo). La pureza del péptido fue > 90% y se verificó mediante HPLC analítica y espectrometría de masas. En la Tabla 1 y Tabla 2 (a continuación) se muestran Ejemplos de secuencias peptídicas.

Tabla 1: Péptidos fosfonilados que corresponden al péptido del sitio activo de BuChE fosfonilada.

Nombre del péptido	Secuencia	MW obs.	MW calc.
BuChE-sarín	H <sub>2</sub> N-Lys-Ser-Val-Thr-Leu-Phe-Gly-Glu-Ser( <i>O-iPr</i> )-Ala-Gly-Ala-Ala-Aca-OH	1470,8	1470,6
BuChE-somán	H <sub>2</sub> N-Lys-Ser-Val-Thr-Leu-Phe-Gly-Glu-Ser( <i>O-Pinacoli</i> )-Ala-Gly-Ala-Ala-Aca-OH	1513,4	1512,7
BuChE-GF	H <sub>2</sub> N-Lys-Ser-Val-Thr-Leu-Phe-Gly-Glu-Ser( <i>O-ciclohexil</i> )-Ala-Gly-Ala-Ala-Aca-OH	1511,3	1510,7
BuChE-VX	H <sub>2</sub> N-Lys-Ser-Val-Thr-Leu-Phe-Gly-Glu-Ser( <i>O- etil</i> )-Ala-Gly-Ala-Ala-Aca-OH	1457,2	1456,6

10

Ser es el aminoácido 198 en la proteína.

Tabla 2. Péptidos fosfonilados que corresponden al péptido fosfonilado de seroalbúmina humana (HSA).

Nombre del péptido	Secuencia	MW obs.	MW calc.
HSA-sarín	H <sub>2</sub> N-Leu-Val-Arg-Tyr( <i>O-iPr</i> )-Thr-Lys-Lys-Val-Pro-Gln-Aca-OH	1465,4	1465,7
HSA-somán	H <sub>2</sub> N-Leu-Val-Arg-Tyr( <i>O-Pinacoli</i> )-Thr-Lys-Lys-Val-Pro-Gln-Aca-OH	1507,4	1507,8
HSA-GF	H <sub>2</sub> N-Leu-Val-Arg-Tyr( <i>O-ciclohexil</i> )-Thr-Lys-Lys-Val-Pro-Gln-Aca-OH	1505,3	1505,8
HSA-VX	H <sub>2</sub> N-Leu-Val-Arg-Tyr( <i>O- etil</i> )-Thr-Lys-Lys-Val-Pro-Gln-Aca-OH	1451,3	1451,7

Tyr es el aminoácido 411 en la proteína.

15 **Ejemplo 20 de Referencia. Síntesis de (2Sp, 4R, 5S) y (2Rp, 4R, 5S)-trimetil-5-fenil-1,3,2-oxazafosfolidin-2-tiona (14-Sp y 14-Rp) (Esquema 3).**

Una disolución de dicloruro metilfosfonotioico 7a (10,0 g, 49,6 mmoles) en tolueno (40 ml) se añadió lentamente a una disolución de hidrocloreto de (+)-efedrina 13 (7,39 g, 49,6 mmoles) disuelto en tolueno (260 ml) y trietilamina (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se filtró entonces, se lavó con agua (2 veces), se secó sobre sulfato de sodio, y se concentró *a vacío*. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo, 9:1, v:v) para producir 2,0 g (sólido blanco, 17%) de **14-S<sub>p</sub>**, seguido de 1,5 g (sólido blanco, 13%) de **14-R<sub>p</sub>**. Se determinó que la pureza de los enantiómeros (**14-S<sub>p</sub>** y **14-R<sub>p</sub>**) era > 95% mediante análisis de RMN <sup>1</sup>H: (**14-S<sub>p</sub>**), RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,27-7,39 (m, 5H), 5,67 (dd, J = 5,9, 2,3

20



Hz, 3H), 3,63 (septuplete aparente, 1H), 2,77 (d,  $J = 12,1$  Hz, 3H), 2,07 (d,  $J = 14,6$  Hz, 3H), 0,75 (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H); y (**14-S<sub>p</sub>**), RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,29-7,40 (m, 5H), 5,48 (dd,  $J = 5,6, 3,4$  Hz, 3H), 3,63 (m, 1H), 2,68 (d,  $J = 12,7$  Hz, 3H), 1,95 (d,  $J = 14,0$  Hz, 3H), 0,82 (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H).

**Ejemplo 21 de Referencia. Preparación general de ácidos Rp- y Sp-alcuilitiofosfónico (15-Sp, 16-Sp, 17-Sp, 15-Rp, 16-Rp, 17-Rp).**

Una mezcla 1:1 en volumen del alcohol necesario (ROH = **a**: isopropanol, **b**: ciclohexanol, **c**: 3,3-dimetil-2-butanol) saturada con ácido clorhídrico anhidro y 2-butanona (3 ml) se añadió a disoluciones individuales de **14** (**S<sub>p</sub>** o **R<sub>p</sub>**, 500 mg, 2,07 mmoles) en 2-butanona (3,5 ml) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La mezcla se vertió después en carbonato de sodio ac. al 10% (12,5 ml), se diluyó con agua (25 ml) y con etanol (40 ml). Se añadió Pd/C (50 mg), y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de H<sub>2</sub> gaseoso toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla se inundó después con N<sub>2</sub> gaseoso, se filtró, y se concentró para eliminar el etanol. La mezcla acuosa que queda se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo con éter dietílico (30 ml, 3 veces). La capa orgánica se desechó. La capa acuosa se acidificó después hasta pH < 3 con ácido cítrico y se extrajo con cloroformo/alcohol isopropílico 4:1 (15 ml, 5 veces). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró a vacío para producir el producto como un aceite viscoso transparente con el siguiente rendimiento: (**15-S<sub>p</sub>**), 200 mg (63%); (**15-R<sub>p</sub>**), 225 mg, (71%); (**16-S<sub>p</sub>**), 270 mg (67%); (**16-R<sub>p</sub>**), 313 mg (78%); (**17-S<sub>p</sub>**), 152 mg (37%); y (**17-R<sub>p</sub>**), 352 mg (86%). El producto bruto se usó sin purificación adicional tras la verificación mediante RMN: (**15**), RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,70 (s a, 1H), 4,78 (septuplete,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 1,70 (d,  $J = 15,0$  Hz, 3H), 1,25 (triplete aparente,  $J = 6,0$  Hz, 6H); (**16**), RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,11 (s a, 1H), 4,50 (m, 1H), 1,88 (m, 2H), 1,73 (d,  $J = 15,0$  Hz, 3H), 1,19-1,63 (m, 8H); y (**17**), RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (2:1 mezcla de diastereómeros, diastereómero principal) δ: 5,13 (s a, 1H), 4,33-4,43 (m, 1H), 1,70 (d,  $J = 15,0$  Hz, 3H), 1,22 (triplete aparente,  $J = 6,0$  Hz, 3H), 0,89 (s, 9H); (diastereómero secundario, picos de diagnóstico) δ: 1,77 (d,  $J = 15,0$  Hz, 3H), 1,09 (triplete aparente,  $J = 6,0$  Hz, 3H), 0,90 (s, 9H).

**Ejemplo 22 de Referencia. Preparación general de Rp y Sp metilfosfonotioatos de O-alkil S-dimetilaminoetilo (18-S<sub>p</sub>, 18-R<sub>p</sub>, 19-S<sub>p</sub>, 19-R<sub>p</sub>, 20-S<sub>p</sub>, 20-R<sub>p</sub>).**

Al ácido tiofosfónico correspondiente (**15-S<sub>p</sub>**: 300 mg, 1,95 mmoles, **15-R<sub>p</sub>**: 313 mg, 2,03 mmoles, **16-S<sub>p</sub>**: 346 mg, 1,78 mmoles, **16-R<sub>p</sub>**: 419 mg, 2,16 mmoles, **17-S<sub>p</sub>**: 382 mg, 1,95 mmoles, **17-R<sub>p</sub>**: 447 mg, 2,28 mmoles) en etanol (5 ml) y carbonato de sodio ac. al 10% (8 ml) se añadió hidroyoduro de (2-yodoetil)dimetilamina (1,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se vertió después en salmuera y se extrajo en diclorometano. La capa orgánica se concentró para producir un aceite bruto que se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice ultrarrápida (0-30% de metanol en diclorometano v.v, Teledyne ISCO CombiFlash Rf system, Newark, DE) para producir los productos como aceites transparentes. Se determinó que la pureza era > 95% mediante análisis de RMN <sup>1</sup>H. El rendimiento global y la verificación de los compuestos fueron como sigue: (**18-S<sub>p</sub>**) 140 mg (32%), (**18-R<sub>p</sub>**) 178 mg (39%), (**19-S<sub>p</sub>**) 149 mg (32%), (**19-R<sub>p</sub>**) 210 mg (43%), (**20-S<sub>p</sub>**) 130 mg (25%), (**20-R<sub>p</sub>**) 178 mg (34%); (**18**), RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,72-4,78 (m, 1H), 2,90-3,01 (m, 2H), 2,54-2,62 (m, 2H), 2,26 (s, 6H), 1,75 (d,  $J = 15,8$  Hz, 3H), 1,30 (dd,  $J = 6,3, 30,6$  Hz, 6H); <sup>31</sup>P-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 53,1; (**18-S<sub>p</sub>**), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -21,3° (c 0,020, CH<sub>3</sub>CN); (**18-R<sub>p</sub>**), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +49,7° (c 0,009, CH<sub>3</sub>CN); R<sub>f</sub>(9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>OH) = 0,35; (**19**), RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,50-4,43 (m, 1H), 2,89-3,03 (m, 2H), 2,57-2,66 (m, 2H), 2,28 (s, 6H), 1,93-1,99 (m, 1H), 1,86-1,91 (m, 1H), 1,77 (d,  $J = 15,8$  Hz, 3H), 1,67-1,74 (m, 2H), 1,42-1,56 (m, 3H), 1,27-1,36 (m, 2H), 1,15-1,24 (m, 1H); <sup>31</sup>P-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 53,0; (**19-S<sub>p</sub>**), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -26,0° (c 0,03, CH<sub>3</sub>CN); (**19-R<sub>p</sub>**), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +34,0° (c 0,021, CH<sub>3</sub>CN); R<sub>f</sub>(9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>OH) = 0,34; (**20**), RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (diastereómero principal) δ: 4,25-4,32 (m, 1H), 2,95-3,12 (m, 2H), 2,64-2,74 (m, 2H), 2,34 (s, 6H), 1,79 (d,  $J = 15,8$  Hz, 3H), 1,34, (d,  $J = 6,3$  Hz, 3H), 0,89 (s, 9H); (picos de diagnóstico del diastereómero secundario) δ: 4,30-4,35 (m, 1H), 1,28, (d,  $J = 6,6$  Hz, 3H), 0,91 (s, 9H); <sup>31</sup>P-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 53,3; (**20-S<sub>p</sub>**), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -14,4° (c 0,008, CH<sub>3</sub>CN); (**20-R<sub>p</sub>**), [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> +28,4° (c 0,01, CH<sub>3</sub>CN); R<sub>f</sub>(9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>OH) = 0,32.

**Ejemplo 23 de Referencia. Síntesis general de yoduro de Rp y Sp 2-(O-alkil(metil)fosforiltio)-N,N,N-trimetiletanaminio (21-Sp, 21-Rp, 22-Sp, 22-Rp, 23-Sp, 23-Rp).**

A una disolución de **18-20** (**18-S<sub>p</sub>**: 70 mg, 0,31 mmoles, **18-R<sub>p</sub>**: 60 mg, 0,27 mmoles, **19-S<sub>p</sub>**: 35 mg, 0,13 mmoles, **19-R<sub>p</sub>**: 30 mg, 0,11 mmoles, **20-S<sub>p</sub>**: 6 mg, 0,02 mmoles, **20-R<sub>p</sub>**: 6 mg, 0,02 mmoles) en benceno (1 ml) se añadió yodometano (1 ml). Esta disolución se dejó reposar a temperatura ambiente toda la noche y después se concentró y se secó a alto vacío para producir producto puro como aceites amarillos claros transparentes. Se determinó que la pureza era > 95% mediante análisis de RMN <sup>1</sup>H. El rendimiento global y la verificación de los compuestos fueron según lo siguiente: (**21-S<sub>p</sub>**) 109 mg (96%), (**21-R<sub>p</sub>**) 69 mg (70%), (**22-S<sub>p</sub>**) 50 mg (94%), (**22-R<sub>p</sub>**) 10 mg (22%), (**23-S<sub>p</sub>**) 6,5 mg (71%), (**23-R<sub>p</sub>**) 5,8 mg (63%); (**21**), RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 4,79-4,82 (m, 1H), 3,62-3,69 (m, 2H), 3,25-3,32 (m, 2H), 3,19 (s, 9H), 1,91 (d,  $J = 20,0$  Hz, 3H), 1,37 (dd,  $J = 20,0, 5,0$  Hz, 3H); <sup>31</sup>P-RMN (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 54,6; (**22**), RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,49-4,55 (m, 1H), 3,61-3,69 (m, 2H), 3,21-3,32 (m, 2H), 3,18 (s, 9H), 1,9-1,96 (2H), 1,92 (d,  $J = 15,0$  Hz, 3H), 1,74-1,76 (m, 2H), 1,53-1,58 (m, 3H), 1,26-1,41 (m, 3H); <sup>31</sup>P-RMN (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 54,7; (**23**), RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) diastereómero principal δ: 4,31-4,37 (m, 1H), 3,59-3,68 (m, 2H), 3,22-3,32 (m, 2H), 3,18 (s, 9H), 1,93 (d,  $J = 15,0$  Hz, 3H), 1,32-1,39 (m, 3H), 0,92 (t aparente,  $J = 10,0$  Hz, 9H); <sup>31</sup>P-RMN (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 54,9.

**Ejemplo 24 de Referencia. Síntesis de (2Rp, 4R, 5S) y (2Sp, 4R, 5S)-clorodimetil-5-fenil-1,3,2-oxazafosfolidin-2-tiona (24-Rp y 24-Sp).**

Una disolución de cloruro de tiofosforilo 7b (4,2 ml, 41 mmoles) en tolueno (25 ml) se añadió lentamente a una suspensión de (+)-efedrina 13 (8,60 g, 43 mmoles) y trietilamina (35 ml) en tolueno (150 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche y después se vertió en acetato de etilo y se extrajo con agua (3 veces). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró a vacío para producir un aceite amarillo que solidificó al reposar. Se encontró que el material bruto era una mezcla 3:1 de los isómeros  $R_p:S_p$ . La purificación de la mezcla bruta consistió en hacer pasar el material a través de una columna de sílice (4 pulgadas de altura por 3 pulgadas de diámetro) usando diclorometano como eluyente seguido de cromatografía en columna en gel de sílice ultrarrápida (0-10% de acetato de etilo/hexanos, v:v) para dar 1,60 g (15%) de **24-R<sub>p</sub>** (mancha superior) y 5,52 g (53%) de **24-S<sub>p</sub>** (mancha inferior). Se determinó que la pureza de los enantiómeros (**24-S<sub>p</sub>** y **24-R<sub>p</sub>**) era > 95% mediante análisis de RMN <sup>1</sup>H: (**24-R<sub>p</sub>**), RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,30-7,44 (m, 5H), 5,83 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 3,83 (dq, 1H), 2,92 (d, J = 14,6 Hz, 3H), 0,88 (d, J = 6,9 Hz, 3H); y (**24-S<sub>p</sub>**), RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,32-7,41 (m, 5H), 5,60 (t, 7,3 Hz, 1H), 3,75 (sexteto, J = 6,0 Hz, 1H), 2,73 (d, J = 16,8 Hz, 3H), 0,80 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

**Ejemplo 25 de Referencia. Síntesis de (2Sp, 4R, 5S) y (2Rp, 4R, 5S)-N,N-dimetilamino-dimetil-5-fenil-1,3,2-oxazafosfolidin-2-tiona (25-Sp y 25-Rp).**

Una disolución de **24** (isómero  $S_p$  o  $R_p$ , 1,00 g, 3,82 mmoles) en tolueno seco (10 ml) en un tubo de presión se burbujeó con dimetilamina gaseosa anhidra. Después de 1 minuto, el tubo se cerró herméticamente y se agitó a temperatura ambiente. Después de 4 horas, la mezcla se filtró, se diluyó con acetato de etilo, y se lavó con agua (2 veces). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró a vacío para producir **25-S<sub>p</sub>** (1,03 g, 100%) o **25-R<sub>p</sub>** (1,03 g, 100%) como un aceite amarillo. El material bruto se usó sin purificación adicional. Se determinó que la pureza de los enantiómeros (**25-S<sub>p</sub>** y **25-R<sub>p</sub>**) era > 95% mediante análisis de RMN <sup>1</sup>H: RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,28-7,38 (m, 5H), 5,67 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 3,53 (sexteto, J = 6,0 Hz, 1H), 2,95 (s, 3H), 2,91 (s, 3H), 2,60 (d, J = 11,8 Hz, 3H), 0,75 (d, J = 6,6 Hz, 3H).

**Ejemplo 26 de Referencia. Síntesis de Sp y Rp dimetilfosforamidato de O-etilo y O-hidrogeno (26-Sp y 26-Rp).**

A una disolución de **25-S<sub>p</sub>** (500 mg, 1,85 mmoles) o **25-R<sub>p</sub>** (503 mg, 1,86 mmoles) en etanol absoluto (2 ml) se añadió una disolución de etanol (2 ml) saturada con cloruro de hidrógeno. Tras agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla se basificó hasta pH ~12 con hidróxido de sodio ac. (10N) y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se extrajo con éter dietílico (3 veces). La capa orgánica se desechó, y la capa acuosa se acidificó hasta pH < 3 con ácido cítrico y se extrajo con cloroformo/alcohol isopropílico 4:1 (3 veces). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró a vacío para producir **26-S<sub>p</sub>** (308 mg, 98%) o **26-R<sub>p</sub>** (315 mg, 100%) como un aceite viscoso transparente. El material bruto se usó sin purificación adicional. Se determinó que la pureza de los enantiómeros (**24-S<sub>p</sub>** y **24-R<sub>p</sub>**) era > 95% mediante análisis de RMN <sup>1</sup>H: RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 3,60 (cuadruplete, J = 7,5 Hz, 2H), 2,82 (s, 3H), 2,79 (s, 3H), 1,32 (t, J = 7,5 Hz, 3H).

**Ejemplo 27 de Referencia. Síntesis de yoduro de Sp y Rp 2-((dimetilamino)(etoxi)fosforiltio)-N,N,N-trimetiletanaminio (27-Sp y 27-Rp) (Esquema 2).**

A una disolución de **26-S<sub>p</sub>** (645 mg, 3,81 mmoles) o **26-R<sub>p</sub>** (315 mg, 1,86 mmoles) en etanol (10 ml) y carbonato de sodio ac. al 10% (10 ml) se añadió hidroyoduro de (2-yodoetil)dimetilamina (1,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche, después se vertió en salmuera y se extrajo con diclorometano (3 veces). La capa orgánica que contiene (S)-dimetilfosforamidato de O-etilo y S-2-(dimetilamino)etilo (**27-S<sub>p</sub>** o **27-R<sub>p</sub>**) se concentró hasta ~3 ml, después se diluyó con benceno (3 ml), y se añadió yoduro de metilo en exceso (3 ml). La mezcla se dejó reposar sin agitación a temperatura ambiente toda la noche. El sólido precipitado **28-S<sub>p</sub>** (127 mg, 9%) o **28-R<sub>p</sub>** (67 mg, 9%) se recogió decantando el líquido y secando a alto vacío. Se determinó que la pureza de los enantiómeros (**27-S<sub>p</sub>** y **27-R<sub>p</sub>**) era > 95% mediante análisis de RMN <sup>1</sup>H: RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 4,12-4,20 (m, 4H), 3,76 (t, J = 9,0 Hz, 2H), 3,34 (s, 9H), 2,78 (s, 3H), 2,74 (s, 3H), 1,36 (t, J = 9,0 Hz, 3H); <sup>31</sup>P-RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 35,7.

**Ejemplo 28. Conjugación de péptidos a KLH activada con maleimida.**

El péptido modificado con OP o el péptido de control natural se disolvió en agua a una concentración de 10 mg/ml. Esta disolución (10 µl, 1 mg) se añadió a KLH activada con maleimida liofilizada en PBS (4,3 mg de peso total) disuelta en 69 µl de agua. La disolución transparente resultante se mantuvo a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitorizó mediante TLC para comprobar la desaparición del péptido. Después de 24 h, la muestra se transfirió a un casete de diálisis Slide-a-lyzer MWCO 3500 (Pierce Chemical Co.) y se dializó frente a PBS a 4°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de BCA. Esta conjugación se combinó con conjugaciones previas para la generación de anticuerpos.

**Ejemplo 29. Método general para la producción de anticuerpos monoclonales frente a aductos de péptidos con OP.**

Para inmunizar a los ratones (tres ratones por antígeno), se usaron antígenos formados por péptidos naturales y péptidos conjugados a OP acoplados a la proteína portadora KLH, seguido del cribado de sangrados de ensayo frente al antígeno inmunizante para identificar sueros con título elevado de IgG y título bajo de IgM. Una vez que los títulos tuvieron niveles aceptables, las células del bazo procedentes de esos ratones se fusionaron con células de mieloma. Las células híbridas se cribaron entonces frente al antígeno para identificar y aislar clones celulares que producen anticuerpo con la selectividad deseada. Los clones positivos se sometieron a dos rondas de subclonación seguido del ensayo de ELISA para asegurar la pureza de células que expresan los anticuerpos apropiados. Mostrado en la Tabla 3, se logró la generación del primer anticuerpo monoclonal, específico para BChE-sarín con sensibilidad hasta al menos la dilución 1:1000.

Tabla 3. Sumario de antígenos de BChE en forma de aducto con OP y formación de hibridoma

Compuesto HBRI	Aducto de OP	Aducto ELISA #1	Subclon #1	Aducto ELISA #2	Subclon #2	ELISA de aducto final
MTM-III-004	Sarín	√	√	√	√	√
MTM-III-018	VX	√	√	√	√	√
MTM-III-019	somán	√	√	√	√	√
MTM-III-040	GF	√	√	√	√	√
MTM-II-195	ninguno (control)	√	√	√	√	√

### Ejemplo 30. Crecimiento de células de hibridoma

Las estirpes de células de hibridoma se distribuyeron en alícuotas en múltiples viales y se almacenaron en nitrógeno líquido. Los viales se descongelaron rápidamente (1-2 min.) a 37°C y se mezclaron con medio RPMI/10% de suero fetal bovino (FBS). Las células se recogieron mediante centrifugación a baja velocidad, se resuspendieron en medio reciente, se contaron usando tinción con azul de tripán para determinar la concentración y viabilidad, y se sembraron en placas hasta una concentración óptima de 0,2-0,3 x 10<sup>6</sup> células por ml. Los cultivos se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS (v/v), glutamina y Pen/Strep, y se expandieron gradualmente a matraces de T175 (175 cm<sup>2</sup>) según se requiera. Para asegurar la viabilidad de las células y su función específica, se siguió un calendario normal de subcultivo y monitorización. Puesto que la mayoría de las estirpes de células de hibridoma son semiadherentes, tanto las células adherentes flotantes como las raspadas procedentes de los matraces se recolectaron para la pasada habitual. Con la expansión del cultivo, los viales de las réplicas que contienen 4 x 10<sup>5</sup> células/ml en FBS/20% de DMSO se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido.

### Ejemplo 31. Ensayos de ELISA.

El medio de cultivo se ensayó para confirmar la producción de mAb apropiado mediante ELISA indirecto usando péptidos nativos y conjugados con OP apropiados, proteína portadora KLH, y medio no de hibridoma como controles. Placas de ELISA de fondo plano de 96 pocillos de alta unión se revisten con 1 µg/pocillo de antígeno toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con PBS/Tween-20 (PBST), los pocillos se bloquean con 1% de gelatina de pescado fría durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBST, se aplican diluciones en serie del medio de hibridoma, y la placa se incuba 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lava varias veces como antes, y se aplica anticuerpo secundario (dilución 1:5000 de conjugado antirratón de cabra con peroxidasa de rábano picante (HRP)), y la placa se incuba una hora a temperatura ambiente. Después de los lavados con PBST, se añaden 100 µl/pocillo de sustrato TMB, y la placa se incuba 30 minutos para el desarrollo del color. Las reacciones se detienen con 100 µl de ácido sulfúrico 0,18 M, y se determina la absorbancia a 450 nm. Los medios acondicionados que contienen mAb en niveles claramente por encima de los controles negativos a diluciones de al menos 1:1000 se usan para la purificación de mAb mediante FPLC.

### Ejemplo 32. Purificación de mAb

La purificación del anticuerpo monoclonal se realiza usando FPLC de afinidad para capturar y eluir los mAb del medio acondicionado con hibridoma usando proteína G acoplada a sefarosa. La proteína G se une a la región Fc de IgG de la mayoría de las especies a pH y fuerza iónica fisiológicos o cerca de ellos. La resina Protein G Sepharose 4 Fast Flow se puede usar para aislar y purificar clases, subclases y fragmentos de inmunoglobulinas de cualquier fluido biológico o medio de cultivo celular. La columna de FPLC se equilibra inicialmente con amortiguador de unión (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,0). Tras cargar una muestra filtrada a través de filtro de 0,2 micrómetros, la proteína no unida se monitoriza mediante UV y se recoge como una muestra reunida. Tras lavados adicionales con amortiguador, IgG se eluye en amortiguador de glicina 0,1 M, pH 2,5, se neutraliza con amortiguador (Tris 1M, pH 9,0), y se estabiliza con NaCl 150 mM. Las columnas se limpian entonces con lavados adicionales con amortiguador

de elución y de unión para el almacenamiento. El mAb purificado se cuantifica usando el ensayo de BCA, y se almacena congelado en glicerol al 50%.

### Ejemplo 33. Ensayos bioquímicos

5 Análisis de transferencia western. Para determinar la calidad de los anticuerpos mediante transferencia western, se usan geles desnaturizantes con SDS al 10% con hSA pura (1  $\mu\text{g}$ , 10 ng y 100 pg), suero humano (2  $\mu\text{l}$  de suero, dilución 1:100 y dilución 1:10.000), y hBuChE puro (1  $\mu\text{g}$ , 10 ng y 100 pg). Los geles se transfieren sobre membranas de polidifluoruro de vinilo (PVDF) y se bloquean con 5% de leche en PBST (amortiguador de fosfato con 0,2% de tween-20). Las membranas de PVDF se manchan primeramente con anticuerpos primarios (suero procedente de sangrado previo, sangrado # 3, o sangrado final) a dilución 1:1000, 1:2000, o 1:5000 en 1% de leche en PBST (0,2% de tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavan 3 veces con PBST, cinco minutos cada lavado. El anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra conjugado con enzima de peroxidasa de rábano picante) se aplica sobre las membranas con dilución 1:10.000 en 1% de leche en PBST (0,2% de tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavan 3 veces con PBST, cinco minutos cada vez. Se añadió sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce) a las membranas que reaccionan con peroxidasa de rábano picante para producir un producto quimioluminiscente que se puede visualizar exponiendo la mancha a la película. El péptido de control (no fosfonilado) para hSA experimenta la conjugación con CP (KLH) y el protocolo subsiguiente de obtención del anticuerpo. Los anticuerpos policlonales se aíslan y evalúan mediante análisis de transferencia Western.

20 Identificación de modificaciones con OP en proteínas. Un reactivo reactivo para OP, por ejemplo **18-Rp, 19-Rp, 20-Rp, 21-Rp, 22-Rp, 23-Rp, 27-Rp, 28-Rp** o **18-Sp, 19-Sp, 20-Sp, 21-Sp, 22-Sp, 23-Sp, 27-Sp, 28-Sp**, se disolvió en dimetilsulfóxido para obtener disoluciones 100 mM, y se usó inmediatamente. La butirilcolinesterasa humana se purificó de plasma humano caducado mediante cromatografía de intercambio iónico a pH 4,0 seguido de cromatografía de afinidad en procainamida-Sefarosa, e intercambio aniónico a pH 7 en una columna de HPLC Protein-Pak DEAE 8HR 1000 A, 10 x 100 mm (Waters/Millipore). La butirilcolinesterasa purificada tuvo una actividad de 540 unidades/ml y una concentración de proteína de 0,75 mg/ml.

Inhibición de butirilcolinesterasa. Una alícuota de 0,25 ml de butirilcolinesterasa (0,19 mg = 2,2 nmoles) en disolución salina amortiguada con fosfato de pH 7,4 se trató con 1  $\mu\text{l}$  de análogo de OP 100 mM a 21°C durante 17 h. La relación molar de butirilcolinesterasa a agente nervioso fue 1:45.

30 Ensayo de actividad de butirilcolinesterasa. El ensayo contenía butiriltiocolina 1 mM, ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico) 0,5 mM en 2 ml de fosfato potásico 0,1 M pH 7,0 a 25°C, y 1  $\mu\text{l}$  de butirilcolinesterasa. El incremento de absorbancia a 412 nm se registró en un espectrofotómetro Gilford. La actividad se calculó a partir del coeficiente de extinción de 13.600  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Las unidades de actividad son micromoles de sustrato hidrolizados por min.

35 Digestión con tripsina. El agente nervioso tratado con BChE se desnaturizó en un baño de agua hirviendo durante 10 min. La disolución enfriada recibió 2  $\mu\text{l}$  de bicarbonato de amonio 1 M para elevar el pH hasta alrededor de 8,3, y 10  $\mu\text{l}$  de tripsina 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La digestión se produjo toda la noche a 37°C.

40 HPLC. Las digestiones se centrifugaron para eliminar un pelete, y se inyectaron en una columna Phenomenex C18, 100 x 4,6 mm, en un sistema Waters 625 LC. Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 60 min. partiendo de 100% de amortiguador A (0,1% de ácido trifluoroacético en agua), y terminando con 60% de amortiguador B (acetonitrilo que contiene 0,09% de ácido trifluoroacético) a un caudal de 1 ml por min. Se recogieron fracciones de un ml.

45 Espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF. La digestión antes de la separación mediante HPLC, así como cada fracción de HPLC, se analizó en el modo MS en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF 4800 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se colocó una alícuota de 0,5  $\mu\text{l}$  en un Opti-TOF 384 Well Insert (P/N 1016629, Applied Biosystems), se secó, y se le superpusieron 0,5  $\mu\text{l}$  de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (10 mg/ml en 50% de acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético). Los espectros de MS se adquirieron usando extracción retrasada en el modo reflector con una intensidad de láser de 3500 voltios. Cada espectro fue la suma de 500 disparos de láser. El instrumento se calibró con patrones de Glu-Fibrinopéptido. Los espectros se guardaron en el DATA EXPLORER, en el que una ventana de resultados enumeró el área de agrupamientos para cada pico. Las cantidades relativas de péptidos fosfonilados antes y después del envejecimiento se calcularon a partir de las áreas de agrupamiento.

50 La secuencia peptídica y la identidad del aminoácido modificado se determinaron fragmentando los iones progenitores en el modo MS/MS del espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF. Los iones y e iones b se asignaron con la ayuda del Proteomics Toolkit, un calculador de iones de fragmentos en línea libre (<http://db.systemsbio.net>).

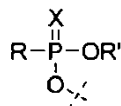
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I):



en la que:

5 OP es



seleccionado del grupo que consiste en reactivos de organofósforo reactivos, agentes nerviosos y plaguicidas, en la que P es estereoisómero  $S_p$ , estereoisómero  $R_p$ , o una mezcla de los mismos;

10 R es alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo sustituido, alquilidenilo, alquilidenilo sustituido, alquencilidenilo, alquencilidenilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, amino, amino sustituido, alquilamino, acilamino, trifluorometilo, trifluorometoxi, ciano, metilo, etilo, isopropilo, n-propilo, n-butilo, terc-butilo, ciclohexilo, pinacolilo, metoxi, etoxi, propoxi, o dimetilamino;

15 R' se selecciona del grupo que consiste en alquilo, alquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, alquinoilo, alquinoilo sustituido, alquilidenilo, alquilidenilo sustituido, alquencilidenilo, alquencilidenilo sustituido, haloalquilo, hidroxialquilo, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, trifluorometilo, metilo, etilo, isopropilo, pinacolilo, y ciclohexilo;

X es oxígeno, azufre, selenio o imino;

20 Péptido es una secuencia de aminoácidos que contiene serina, treonina o tirosina, a la que se une un OP, en la que el número total de aminoácidos está entre 7 y 41;

Enlazador es un aminoácido u otro reactivo bifuncional capaz de enlazar covalentemente OP-péptido a la CP;

CP es una proteína conjugada usada para presentar haptenos para la generación de anticuerpos;

y sales de los mismos.

25 2. El compuesto de Fórmula (I), en el que la secuencia peptídica deriva de proteínas modificadas mediante un agente nervioso de OP.

3. El compuesto de Fórmula (I), en el que la secuencia peptídica imita el sitio activo de AChE o BuChE.

4. El compuesto de Fórmula (I), en el que la secuencia peptídica imita la región alrededor de tirosina 411 de seroalbúmina humana.

30 5. El compuesto de fórmula (I), en el que la CP es hemocianina de lapa californiana (KLH).

6. El compuesto de fórmula (I), en el que la CP es seroalbúmina bovina (BSA).

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que la secuencia deriva de proteínas modificadas mediante un plaguicida.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el enlazador es ácido aminocaproico.

35 9. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el enlazador es cisteína.

10. Un método para generar anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para un OP-Péptido, comprendiendo el método:

el uso de compuestos de Fórmula (I) de la reivindicación 1 como inmunógenos para la generación de anticuerpos,

40 en el que dicho compuesto se inyecta en conejos, ratones o cabras según protocolos estándar para provocar la producción de anticuerpos,

con la condición de que el uso no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

- 5 11. El uso de anticuerpos obtenidos mediante el método de la reivindicación 10 para determinar la presencia, identidad y cantidad de aductos de OP en fluidos biológicos, para determinar la exposición a agentes nerviosos, plaguicidas, u otros agentes de OP conocidos por modificar covalentemente proteínas.