

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 945**

21 Número de solicitud: 201631470

51 Int. Cl.:

**C07K 14/76** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 14/38** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**17.11.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.06.2018**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070759**

71 Solicitantes:

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

**C/ Serrano, 117**

**28006 Madrid ES y**

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ABAD FUENTES, Antonio;**

**MERCADER BADIA, Josep Vicent;**

**ABAD SOMOVILLA, Antonio;**

**AGULLÓ BLANES, Consuelo y**

**LÓPEZ PUERTOLLANO, Daniel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **PREPARACIÓN DE NUEVOS BIOCONJUGADOS Y ANTICUERPOS PARA LA  
INMUNODETECCIÓN DE OCRATOXINA A**

57 Resumen:

Preparación de nuevos bioconjugados y anticuerpos para la inmunodetección de ocratoxina A.

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

ES 2 672 945 A1

**PREPARACIÓN DE NUEVOS BIOCONJUGADOS Y ANTICUERPOS PARA LA  
INMUNODETECCIÓN DE OCRATOXINA A**

**DESCRIPCIÓN**

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

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Las biotoxinas son un tipo de contaminante cuya presencia en alimentos, aguas y piensos representa un verdadero problema para la salud humana y el bienestar  
20 animal, ocasionando importantes pérdidas económicas a los sectores agroalimentario, agropecuario y piscícola. La clase de biotoxinas más frecuentemente detectadas en alimentos son las producidas por hongos, o micotoxinas. Aunque se han identificado más de 400 diferentes micotoxinas con una gran diversidad estructural, es sobre las toxicológicamente más relevantes sobre las que existe una reglamentación más  
25 definida en cuanto a los límites máximos permitidos en alimentos.

La ocratoxina A es la micotoxina más importante de la familia de las ocratoxinas. Estructuralmente consiste en una molécula de L-fenilalanina unida, a través de un puente amida, a un grupo p-clorofenólico que contiene un grupo de dihidroisocumarina  
30 (Figura 1). Los principales efectos nocivos de esta micotoxina son nefrotóxicos, aunque también se ha observado actividad hepatotóxica, neurotóxica, teratogénica, inmunotóxica y carcinogénica en diferentes especies animales. La ocratoxina A es sospechosa de ser la causa de enfermedades crónicas de desenlace fatal, como la

nefropatía endémica de los Balcanes (BEN) y la nefropatía de Túnez (TCIN). Además, dado que el consumo de alimentos contaminados con OTA está asociado con una mayor incidencia de tumores en el tracto urinario superior en el hombre, esta micotoxina ha sido clasificada como posible carcinógeno por la *International Agency*  
5 *for Research on Cancer* (IARC). Dos especies del género *Penicillium* producen ocratoxina A: *P. verrucosum*, la principal fuente de contaminación en grano almacenado, y *P. nordicum*, el mayor productor encontrado en productos cárnicos. No obstante, la mayoría de los hongos ocratoxigénicos son del género *Aspergillus*, y particularmente uno de los principales productores es *A. carbonarius*, el cual se  
10 encuentra frecuentemente en viñedos. Por orden de aporte de ocratoxinas totales a la dieta encontramos los cereales (58%), el vino (21%), el zumo de uva (7%), el café (5%) y la carne de cerdo (3%).

Las técnicas analíticas para la determinación de ocratoxina A en alimentos son  
15 fundamentalmente de dos tipos: cromatográficas y de reconocimiento molecular. Entre las primeras, la que goza de más aceptación actualmente es HPLC-MS/MS, mientras que entre las segundas la mayoría emplea anticuerpos como elemento de detección. Las técnicas cromatográficas constituyen la metodología de referencia, debido a su elevada sensibilidad, reproducibilidad y fundamentalmente por su  
20 capacidad de determinar varias micotoxinas simultáneamente (K. F. Nielsen et al., *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 1029-1034). Por su parte, las técnicas basadas en la interacción anticuerpo-analito (inmunoensayos, cromatografía de afinidad, tiras inmunorreactivas) se consideran la mejor opción cuando es necesario realizar un elevado número de análisis en poco tiempo y/o en entornos poco dotados  
25 técnicamente. De hecho, las micotoxinas, y en particular la ocratoxina A, constituyen probablemente el grupo de contaminantes en donde estos métodos rápidos inmunoquímicos han alcanzado un mayor grado de aceptación e implantación, existiendo un gran número de empresas de inmunodiagnóstico que comercializan ensayos tipo kit para la detección de estos contaminantes (E. P. Meulenber, *Toxins*  
30 **2012**, 4, 244-266).

Los métodos inmunoanalíticos se basan en la unión selectiva, reversible y no covalente entre la sustancia a detectar (analito) y un anticuerpo que la reconoce específicamente. La ocratoxina A, debido a su bajo peso molecular, no es

inmunogénica, y por tanto es incapaz de generar una respuesta inmune por sí misma cuando se inyecta en un animal de experimentación. Para poder generar anticuerpos para ocratoxina A es necesario acoplarla covalentemente a una proteína, de forma que el conjugado obtenido sí resulte inmunogénico y permita la producción de anticuerpos frente a la micotoxina. Para conseguir obtener estos conjugados, a menudo es necesario recurrir al diseño y síntesis *ex novo* de un derivado, a través de estrategias que permitan la incorporación, en la posición deseada de la molécula, de una cadena hidrocarbonada con un grupo funcional terminal, respetando su estructura y grupos químicos característicos. Esta estrategia posibilita presentar la molécula al sistema inmune de la manera más adecuada para lograr anticuerpos de gran afinidad y especificidad. Sin embargo, la ocratoxina A posee en su estructura un grupo carboxilato que posibilita el anclaje directo a la proteína, por lo que, debido a las dificultades sintéticas que conlleva la síntesis total de derivados potencialmente más adecuados desde el punto de vista estructural, todos los anticuerpos obtenidos hasta la fecha capaces de reconocer a ocratoxina A se han obtenido empleando dicho grupo carboxilato para la obtención de los conjugados. La efectividad de esta estrategia ha sido muy variable (X. Li et al., *Food Anal. Methods* **2013**, 6, 1433–1440). En todo caso, la generación de anticuerpos para ocratoxina A a partir de haptenos en los que el grupo carboxilato se encuentre libre y por tanto pueda interactuar con el anticuerpo, constituye una vía no explorada que podría permitir la generación de anticuerpos con características diferentes a las de los actualmente disponibles, adecuados no sólo para el desarrollo de inmunoensayos más sensibles y específicos, sino también para su implementación en nuevas plataformas analíticas basadas en tecnologías avanzadas, tales como biosensores de diferente tipo, ensayos multiplex y métodos basados en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

Existe por tanto la necesidad de obtener derivados funcionalizados de ocratoxina A no explorados anteriormente que permitan la generación de anticuerpos de mayor afinidad que los producidos hasta la fecha. Estos anticuerpos mejorados obtenidos a partir de haptenos innovadores constituirán la base para desarrollar nuevos métodos inmunoanalíticos para la determinación, detección, concentración o extracción de ocratoxina A, preferentemente mediante la utilización de un kit que pueda ser utilizado por la industria alimentaria, agrícola, clínica y/o medioambiental.

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona bioconjugados y derivados marcados de ocratoxina A, y el uso de los bioconjugados para la obtención de anticuerpos para ocratoxina A.

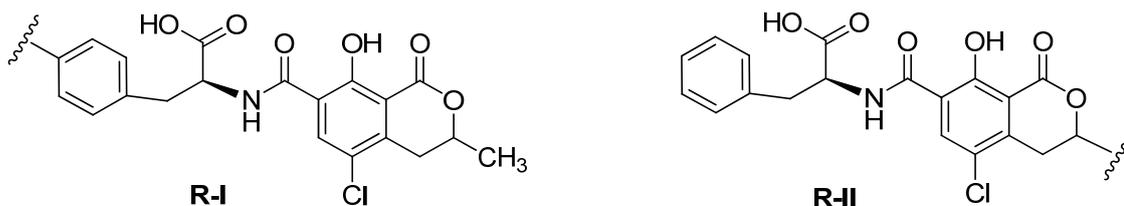
5

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un bioconjugado de fórmula general (I):



donde:

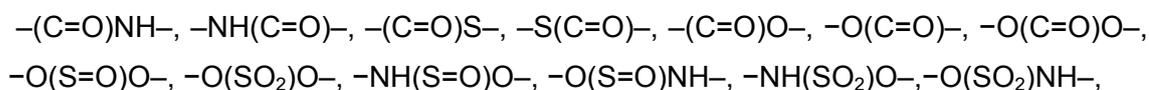
T se selecciona del grupo que consiste en R-I y R-II;



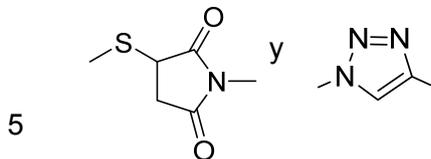
15 Preferiblemente T es R-I.

L es una cadena hidrocarbonada de 0 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende la sustitución de entre 0 y 10 átomos de carbono por heteroátomos, que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N; preferiblemente L es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N, y más preferiblemente L es una cadena hidrocarbonada lineal saturada de 1 a 10 átomos de carbono y opcionalmente la cadena hidrocarbonada comprende entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; y

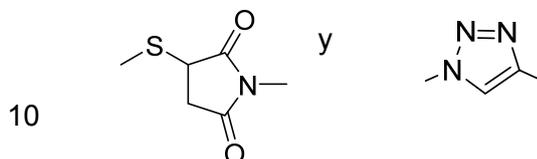
25 Z es un grupo funcional seleccionado entre:



$-(\text{SO}_2)\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}(\text{SO}_2)-$ ,  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  
 $-\text{NH}(\text{C}=\text{S})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{N}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_6)-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S}-\text{S}-$ ,  $-\text{NH}-\text{NH}-$ ,  $-\text{N}=\text{C}-$ ,  $-\text{C}=\text{N}-$ ,  
 $-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})-$ ,  $-\text{N}=\text{N}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,



En una realización preferida, **Z** se selecciona del grupo que consiste en  $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$ ,  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,



Más preferentemente, **Z** es  $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ .

**P** es un péptido o polipéptido, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 daltons. El péptido o polipéptido **P** puede estar o no unido, mediante interacción covalente, electrostática o de otro tipo, a un soporte. Dicho soporte puede ser un polímero sintético o no, o estar compuesto por nanomateriales como nanotubos de carbono, zeolitas o sílice mesoporosa.

15

Según otra realización preferida de la presente invención, el bioconjugado de fórmula (I) descrito en esta solicitud de patente se caracteriza porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, beta-galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa. Más preferiblemente **P** es peroxidasa o albúmina, que puede ser albúmina de huevo o albúmina sérica; y

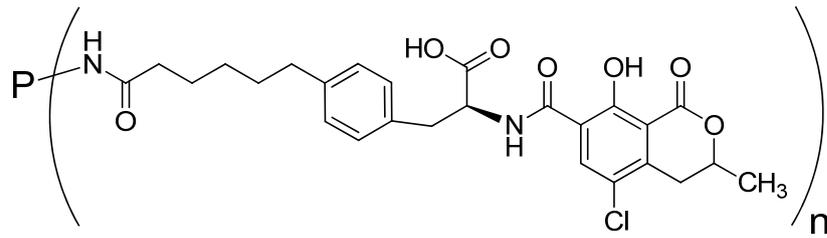
20

**n** es un número con un valor entre 1 y 500; preferiblemente **n** es un valor entre 1 y 100.

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

25

Según otra realización preferida de la presente invención, el bioconjugado de fórmula (I) es un bioconjugado de fórmula (Ia)

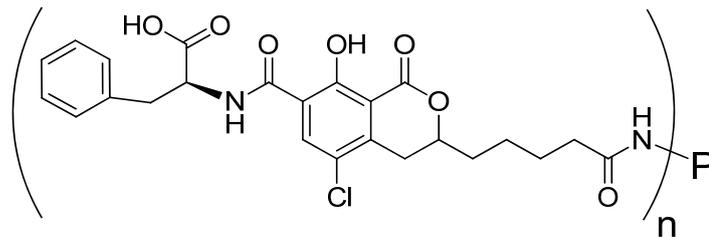


(Ia)

donde:

**P** y **n** se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina o peroxidasa y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Según otra realización preferida, el bioconjugado de fórmula (I) es un bioconjugado de fórmula (Ib)



(Ib)

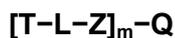
10 donde:

**P** y **n** se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina o peroxidasa y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

El bioconjugado de formula (I) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un derivado funcionalizado (hapteno) de la ocratoxina A con **P**, un polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor a 2000 daltons, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

En otra realización de la presente invención, cuando el material portador es un marcador no isotópico detectable, el derivado es un compuesto de formula (II):

20



(II)

donde **T**, **L** y **Z** tienen el mismo significado definido anteriormente para el bioconjugado  
5 de fórmula (I);

**Q** es un marcador no isotópico detectable; y

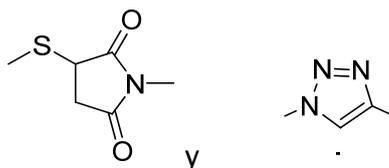
**m** es un número con un valor entre 1 y 1000; preferiblemente **m** es un valor  
10 seleccionado entre 1 y 100.

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

En una realización preferida, **Q** es una enzima, biotina, un compuesto luminiscente, un  
fluoróforo, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta, micro o  
nanopartículas u otros. Preferentemente, **Q** se selecciona del grupo que consiste en  
20 peroxidasa, fosfatasa alcalina, biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados,  
un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un  
bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio,  
nanopartículas cuánticas (en inglés *quantum dots*), y micro- o nanopartículas de oro  
coloidal, de carbón o de látex.

25

Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (II), **Z** se selecciona del grupo que  
consiste en  $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$ ,  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  
 $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,



30

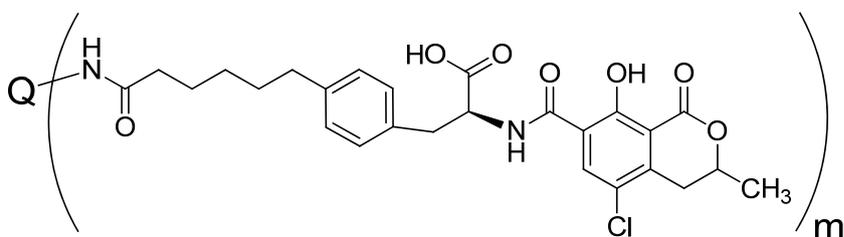
Preferiblemente **L**, en el compuesto de fórmula (II), es una cadena hidrocarbonada  
lineal de 1 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0

y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N, y más preferiblemente **L** es una cadena hidrocarbonada lineal saturada de 1 a 10 átomos de carbono y opcionalmente la cadena hidrocarbonada comprende entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

5

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

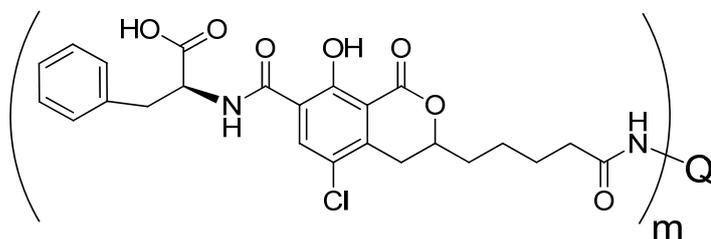
10 Según una realización preferida, el derivado de fórmula (II) es un derivado de fórmula (IIa)



(IIa)

15 donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

Según otra realización también más preferida, el derivado de fórmula (II) es un derivado de fórmula (IIb)



(IIb)

20 donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

El derivado marcado de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un derivado funcionalizado (hapteno) de la ocratoxina A con **Q**, un marcador no isotópico, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

5

El bioconjugado de fórmula (I) de la presente invención puede utilizarse para la producción de anticuerpos, o junto con un anticuerpo de ocratoxina A para determinar o detectar esta micotoxina en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo. Además, los derivados marcados de fórmula (II) pueden utilizarse junto con un anticuerpo de ocratoxina A para determinar o detectar esta micotoxina en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo.

Para obtener anticuerpos frente a ocratoxina A se han preparado derivados funcionalizados de dicha micotoxina (haptenos), es decir, análogos estructurales de ocratoxina A que incorporan un grupo funcional susceptible de ser utilizado para la conjugación a un portador **P** o marcador **Q**. Este grupo funcional está separado del esqueleto de la molécula de ocratoxina A por un espaciador **L**. La posición de incorporación del grupo funcional a la estructura de ocratoxina A para la conjugación no es un aspecto obvio y puede ser determinante para la viabilidad de los bioconjugados de fórmula (I) como inductores de la producción de anticuerpos de afinidad y selectividad adecuadas frente a ocratoxina A, e incluso para la viabilidad de los bioconjugados de fórmula (I) o de derivados marcados de fórmula (II) para actuar como moléculas competidoras que permitan el desarrollo de un inmunoensayo sensible y específico para dicha micotoxina.

25

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

Por tanto, un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo (a partir de ahora anticuerpo de la invención) generado en respuesta a un bioconjugado de la invención, en particular al bioconjugado de fórmula (I). Más preferiblemente los anticuerpos son generados en respuesta al bioconjugado de fórmula (Ia) o (Ib), más preferiblemente al bioconjugado de fórmula (Ia).

30

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del bioconjugado anteriormente descrito para la obtención de anticuerpos.

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

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un antisuero (a partir de ahora antisuero de la invención) que comprende los anticuerpos de la invención.

El término "antisuero" se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el  
15 contexto de la presente invención, el inmunógeno es el bioconjugado de la invención y el antisuero comprende anticuerpos específicos generados frente al bioconjugado de la invención, los anticuerpos de la invención.

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

- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo o el antisuero de la invención;
- b) incubar la muestra y el anticuerpo (o el antisuero) de la etapa (a) durante un periodo  
25 de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica; y
- c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).

El método de la presente invención permite la determinación cuantitativa o análisis  
30 cualitativo del contenido de la micotoxina ocratoxina A en una muestra. Asimismo, el método de la presente invención permite analizar el contenido de ocratoxina A en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de alimentos, como cereales, frutas y vinos, muestras medioambientales tales como agua, suelo o superficie, y

muestras biológicas aisladas tales como orina. Preferentemente, la presente invención proporciona un método de análisis *in vitro* de ocratoxina-A en vinos, cervezas y zumos.

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

El término inmunoensayo hace referencia a un ensayo analítico en el que ocurre una  
10 reacción inmunoquímica para la detección o cuantificación de un analito. Los inmunoensayos competitivos son aquéllos en los que el analito compite con otra molécula por la unión con el anticuerpo.

El término “antígeno” en esta solicitud de patente se refiere a una molécula capaz de  
15 interaccionar específicamente con un anticuerpo. La interacción o reacción inmunoquímica consiste en la unión específica y no covalente entre un anticuerpo y un antígeno, pudiendo ser éste el analito o un antígeno de ensayo.

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

Un sexto aspecto de la presente invención también se refiere a un kit de detección de  
25 ocratoxina A que utiliza al menos un anticuerpo de la invención. Adicionalmente, el kit de detección de ocratoxina A puede comprender un bioconjugado de fórmula (I) o un derivado marcado de fórmula (II) tal como se describen en la presente solicitud de patente.

Un séptimo aspecto de la presente invención también se refiere a un método de  
30 purificación y/o concentración de ocratoxina A de una muestra que comprende el uso del anticuerpo anteriormente descrito. Particularmente, este método se basa en inmovilizar al menos un anticuerpo de la invención sobre un soporte cualquiera y hacer pasar una muestra a través de dicho soporte para que retenga la ocratoxina A presente en dicha muestra. La elución posterior de la ocratoxina A retenida en el

soporte por métodos ampliamente conocidos en la técnica (cambio de pH, modificación de la fuerza iónica, utilización de agentes caiotrópicos) permitirá su purificación y/o concentración, en un sistema conocido como cromatografía de inmunoafinidad. En una realización preferida, este método comprende las siguientes

5 etapas:

- a) inmovilizar al menos un anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 sobre un soporte;
- b) hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que retenga la ocratoxina A presente en dicha muestra; y
- 10 c) eluir la ocratoxina A retenida en el soporte.

Los términos "inmunógeno" e "inmunogénico" tal como se utilizan en la presente invención se refieren a una sustancia que es reconocida como extraña al organismo vivo y por lo tanto es capaz de producir o de generar una respuesta inmune en un

15 huésped. En la presente invención el inmunógeno es un bioconjugado de fórmula (I).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la

20 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

A continuación se ilustra con algunos ejemplos y figuras la forma en que puede efectuarse la preparación de varios derivados funcionalizados de ocratoxina A

25 (haptenos) y los correspondientes bioconjugados de fórmula (I), que no pretenden que sean limitativos de la presente invención, y que sirven para mostrar no sólo la forma en que puede efectuarse la preparación de los mismos sino también la importancia que puede tener la naturaleza estructural del bioconjugado de fórmula (I) para la producción de anticuerpos de afinidad adecuada hacia el analito, aptos para el

30 desarrollo de un eficaz método inmunoanalítico.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Estructura de la ocratoxina-A.

**Fig. 2.** Esquema de la síntesis del éster activo del hapteno OTA-1 (**NHS-OTA-1**).

5 **Fig. 3.** Esquema de la síntesis del éster activo del hapteno OTA-2 (**NHS-OTA-2**).

**Fig. 4.** Esquema de la síntesis del éster activo del hapteno OTA-3 (**NHS-OTA-3**).

**Fig. 5.** Esquema de la preparación de un bioconjugado de fórmula (I) a partir del correspondiente derivado funcionalizado (éster activo) de ocratoxina A.

10 **Fig. 6.** Curvas estándar para ocratoxina A en el formato de ELISA competitivo homólogo directo obtenidas con el mejor anticuerpo monoclonal producido a partir del bioconjugado BSA-OTA-1 (mAb **Ia**#310b; triángulos) y con el mejor anticuerpo monoclonal producido a partir del bioconjugado BSA-OTA-2 (mAb **Ib**#115; círculos).

## EJEMPLOS

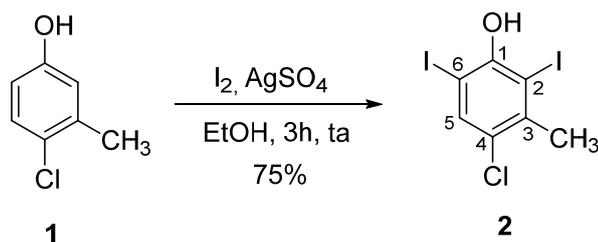
15

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de los bioconjugados de fórmula (I) para la obtención de anticuerpos frente a ocratoxina A y el desarrollo de un inmunoensayo de elevada sensibilidad para la misma. Los números en negrita hacen  
20 referencia a la correspondiente estructura que se muestra en los esquemas. Estos ejemplos se presentan a modo de demostración, pero de ningún modo pueden suponer un límite a la invención.

### 1. Preparación de bioconjugados de fórmula (I)

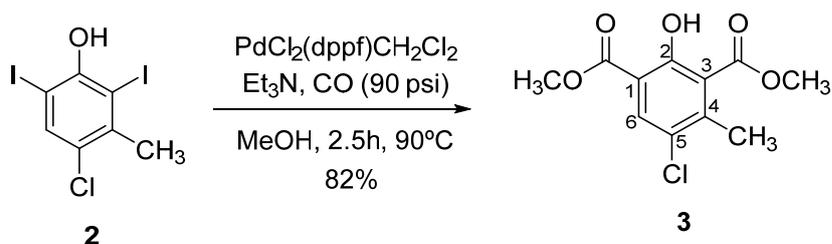
25 **Ejemplo 1:** Preparación de bioconjugados de fórmula (I) para **T = R-I**, **L =** CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, **Z =** -(C=O)NH- y **P =** BSA (seroalbúmina bovina), OVA (ovalbúmina) y HRP (peroxidasa de rábano picante).

1.1. *Preparación del éster de N-hidroxisuccinimidilo del hapteno OTA-1 (**NHS-OTA-1**).*



*Preparación de 4-cloro-2,6-diyodo-3-metilfenol (2).* EtOH absoluto (31 mL) se añadió sobre una mezcla de 4-cloro-3-metilfenol (**1**) (1,78 g, 12,5 mmol), yodo (6,93 g, 27,3 mmol, 2,2 equiv) y AgSO<sub>4</sub> (7,76 g 24,9 mmol, 2 equiv) y la mezcla se mantuvo bajo agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se filtró para separar las sales, utilizando CHCl<sub>3</sub> para lavar. El filtrado se lavó con una disolución acuosa al 10% de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y salmuera. Tras secar sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y evaporar el disolvente a vacío, el residuo obtenido se purificó a través de una columna de gel de sílice, utilizando hexano como eluyente, para obtener el compuesto **2** como un sólido blanco (3,72 g, 75%). Pf. 91,0–92,0 °C (cristalizado de hexano en frío).

Datos espectroscópicos de **2** <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 2.59 (s, 3H, Me-3), 5.83 (s, 1H, OH), 7.72 (s, 1H, H-5). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) 26.8 (Me-3), 77.6 (C-6), 90.5 (C-2), 125.2 (C-4), 137.9 (C-5), 140.3 (C-3), 152.6 (C-1). EMAR (TOF ESI<sup>-</sup>): calculado para C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>ClI<sub>2</sub>O [M-H]<sup>-</sup> 392.8046, encontrado 392.8042.



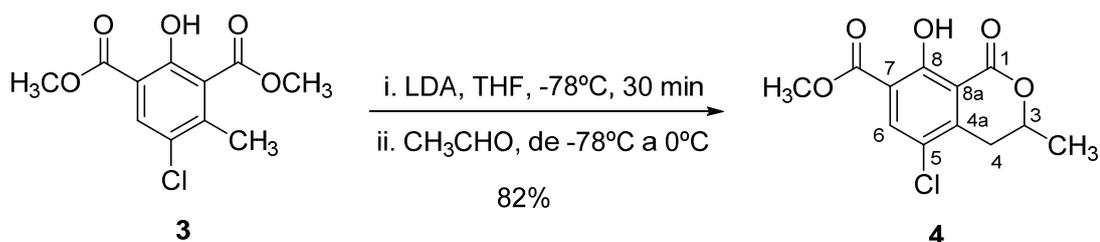
*Preparación de 5-cloro-2-hidroxi-4-metilbenceno-1,3-dicarboxilato de dimetilo (3).* Una mezcla del fenol **2** (300 mg, 0,76 mmol) y PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (64,0 mg, 0,08 mmol, 0,1 equiv) en MeOH anhidro (9 mL) en un reactor tiny Büchi se purgó exhaustivamente por ciclos repetidos de vacío-purga con argón, enfriando a 0 °C. Tras esto, y bajo una corriente de argón, se añadió rápidamente Et<sub>3</sub>N (0,53 mL, 3,8 mmol, 5 equiv) y se volvió a someter el sistema a ciclos de purga a 0 °C, primero con argón y luego con CO. A continuación, se ajustó la presión de CO de 90 psi y la mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 2,5 horas. Transcurrido este tiempo se enfrió el reactor y se

venteó, la mezcla de reacción se transfirió a un matraz de fondo redondo con la ayuda de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se suspendió en  $\text{Et}_2\text{O}$  y se filtró, el filtrado se lavó con una disolución acuosa 1M de HCl y salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se evaporó el disolvente a vacío. El residuo

5 obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt (95:5 y 90:10), para obtener el compuesto **3** como un sólido de color blanco (158,4 mg, 82%). Pf. 66,1–67,1 °C (cristalizado de hexano en frío).

Datos espectroscópicos de **3**:  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 2.35 (s, 3H, Me-4), 3.96 (s, 6H, 2xOMe), 7.87 (s, 1H, H-6), 10.96 (s, 1H, OH).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):

10  $\delta$  (ppm) 18.0 (Me-4), 52.7 (2xOCH<sub>3</sub>), 111.5 (C-3), 124.9 (C-5), 125.1 (C-1), 130.6 (C-6), 141.5 (C-4), 156.8 (C-2), 166.8 (CO<sub>2</sub>-3), 169.1 (CO<sub>2</sub>-1). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClO}_5$  [M+H]<sup>+</sup> 259.0368, encontrado 259.0356.



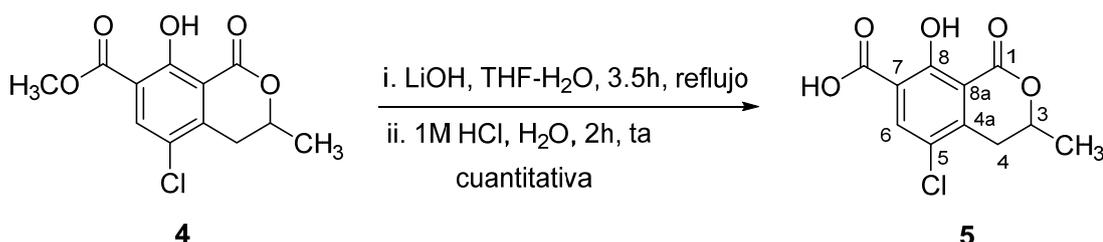
*Preparación de 5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxilato de metilo (4).*

15 Una disolución del dicarboxilato de dimetilo **3** (82,4 mg, 0,32 mmol) en THF anhidro (200  $\mu\text{L}$ ) se adicionó gota a gota, a  $-78^\circ\text{C}$  bajo nitrógeno, sobre una disolución de diisopropilamido de litio (LDA) en THF, generada a partir de diisopropilamina (130  $\mu\text{L}$ , 0,88 mmol, 2,75 equiv), BuLi (500  $\mu\text{L}$  de una disolución 1,6 M en hexano, 0,8 mmol, 2,5 equiv) y THF anhidro (1,15 mL). La mezcla se mantuvo con agitación 30

20 minutos a  $-78^\circ\text{C}$  y a continuación se añadió acetaldehído (150  $\mu\text{L}$ , 2,55 mmol, 8 equiv). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 10 minutos y a  $0^\circ\text{C}$  durante 1,5 horas. Una vez finalizado el tiempo de reacción se añadió 1 mL de una disolución 1:2 de AcOH en  $\text{Et}_2\text{O}$  a  $0^\circ\text{C}$ , se diluyó con AcOEt y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentró a vacío para obtener un

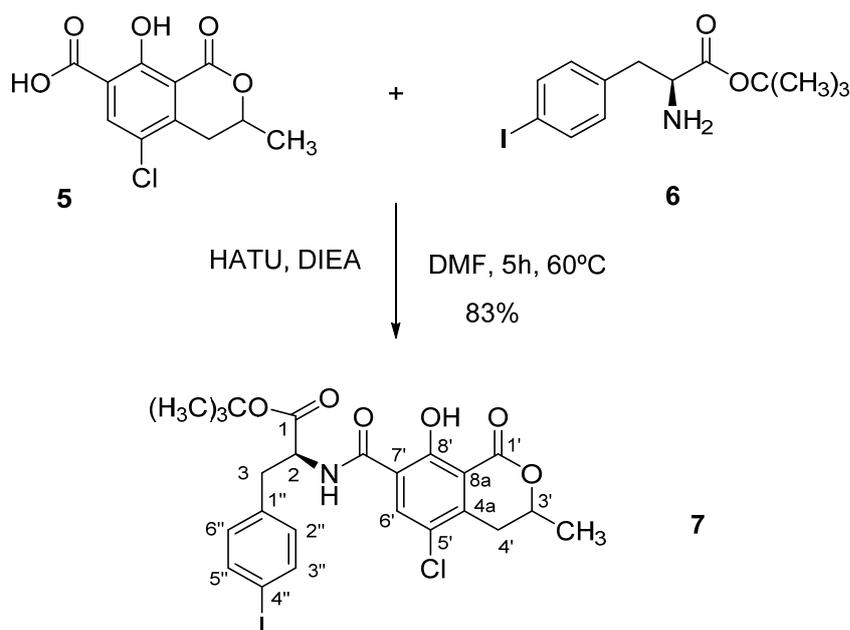
25 residuo que se purificó por cromatografía de columna, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt-AcOH (100:0:0,3 y 95:5:0,3) para obtener el compuesto **4** como un semisólido de color blanco (51,7 mg, 82%).

Datos espectroscópicos de **4** (una mezcla racémica):  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.58 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Me-3), 2.84 (dd,  $J = 17.4, 11.6$  Hz, 1H, H-4), 3.27 (dd,  $J = 17.3, 3.2$  Hz, 1H, H'-4), 3.95 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 4.42-4.92 (m, 1H, H-3), 8.11 (s, 1H, H-6), 12.19 (s, 1H, OH).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 20.6 (Me-3), 32.6 (C-4), 52.6 (OCH<sub>3</sub>), 75.1 (C-3), 111.2 (C-7), 118.4 (C-8a), 121.7 (C-5), 138.0 (C-6), 142.2 (C-4a), 161.1 (C-8), 165.0 (C-1), 167.9 ( $\text{CO}_2$ -7). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  271.0368, encontrado 271.0371.



*Preparación del ácido 5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxílico (5).* Una disolución de  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (115,0 mg, 2,73 mmol, 10 equiv) en agua (1,20 mL) se adició sobre una suspensión de la dihidroisocumarina **4** (74,0 mg, 0,27 mmol) en THF anhidro (910  $\mu\text{L}$ ). La mezcla se calentó a reflujo durante 3,5 horas y a continuación se enfrió a 0 °C y se acidificó con una disolución acuosa 1M de HCl (4,91 mL, 4,91 mmol, 18 equiv). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener el ácido **5** (69,9 mg, 100%) como un sólido amorfo de color pardo claro.

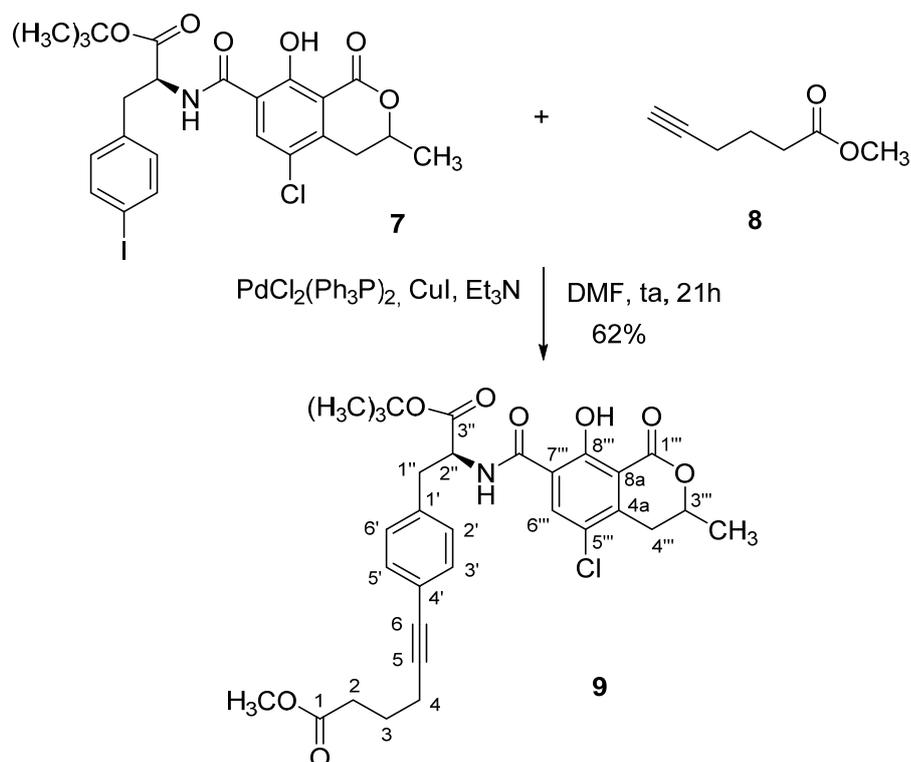
Datos espectroscópicos de **5**:  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.44 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Me-3), 2.88 (dd,  $J = 17.3, 11.6$  Hz, 1H, H-4), 3.20 (dd,  $J = 17.3, 3.2$  Hz, 1H, H'-4), 4.75 (ddd,  $J = 11.7, 6.2, 3.2$  Hz, 1H, H-3), 7.99 (s, 1H, H-6).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 20.1 (Me-3), 32.2 (C-4), 74.4 (C-3), 112.5 (C-7), 117.8 (C-8a), 120.6 (C-5), 136.0 (C-6), 143.4 (C-4a), 160.5 (C-8), 165.4 (C-1), 167.3 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{ClO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  257.0211, encontrado 257.0212.



Preparación de 2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-(4-yodofenil)propanoato de terc-butilo (**7**). A una disolución del ácido **5** (56,3 mg, 0,22 mmol) en DMF anhidra (1,5 mL) se añadieron sucesivamente una disolución de HATU (125,5 mg, 0,33 mmol, 1,5 equiv) en DMF anhidra (1,5 mL) y DIEA (80  $\mu$ L, 0,44 mmol, 2 equiv). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y seguidamente se añadió una disolución de la amina **6** (153 mg, 0,44 mmol, 2 equiv) y DIEA (80  $\mu$ L, 0,44 mmol, 2 equiv) en DMF anhidra y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, tras lo cual la reacción se diluyó con AcOEt y se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de HCl (1M), LiCl (1,5%), NaHCO<sub>3</sub> (5%) y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt-AcOH (100:0:0,3, 90:10:0,3 y 80:20:0,3) para obtener el compuesto **7** (107 mg, 83%) como un aceite amarillento.

Datos espectroscópicos de **7** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.43 (dos s, 4.5H cada uno, CMe<sub>3</sub> de cada diastereoisómero), 1.61 (dos d,  $J = 6.4$ , 1.5H cada uno, Me-3' de cada diastereoisómero), 2.84 y 2.89 (cada uno dd,  $J = 17.4$ , 11.6 Hz, 0.5H cada uno, H-4' de cada diastereoisómero), 3.07-3.24 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3), 3.30 (dd,  $J = 17.4$ , 3.5 Hz, 1H, H'-4'), 4.77 (m, 1H, H-3'), 4.94 (dt,  $J = 7.3$ , 6.0 Hz, 1H, H-2), 6.96 (br d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-2'' y H-6''), 7.56-7.62 (m, 2H, H-3'' y H-5''), 8.44 (s, 1H, H-6'), 8.57 (m, 1H, NH), 12.78 (s ancho, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 20.7 (Me-3'), 28.0 (CMe<sub>3</sub>), 32.3 (C-4'), 37.6 (C-3), 54.3 (C-2), 75.9

(C-3'), 82.6 (CMe<sub>3</sub>), 92.4 (C-4''), 110.0 (C-8a), 120.7 (C-7'), 123.1 (C-5'), 131.5 (C-2'' y C-6''), 136.1 (C-1''), 137.4 (C-3'' y C-5''), 138.9 (C-6'), 140.7 (C-4a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.1 (C-1). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>NCIO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 586.0488, encontrado 586.0459.

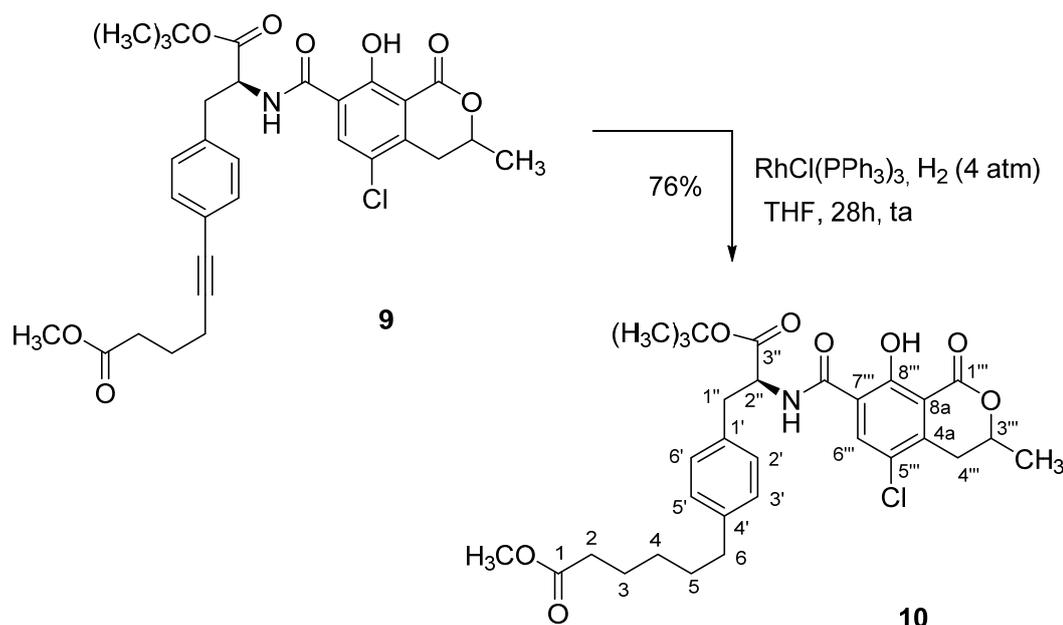


5

*Preparación de 6-(4-(3-(terc-butoxi)-2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-oxopropil)fenil)hex-5-inoato de metilo (9).* Una mezcla del derivado yodado **7** (36,5 mg, 0,062 mmol), hex-5-inoato de metilo (**8**) (27,4 mg, 0,217 mmol, 3,5 equiv), PdCl<sub>2</sub>(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub> (5,1 mg, 7,3·10<sup>-3</sup> mmol, 0,12 equiv) y CuI (2,2 mg, 11,5·10<sup>-3</sup> mmol, 0,18 equiv) se purgó con ciclos repetidos de vacío-nitrógeno mientras se enfriaba a 0 °C. A continuación, se añadió DMF anhidra (730 µL) y se volvió a purgar el sistema, se añadió Et<sub>3</sub>N (540 µL, 3,87 mmol, 62 equiv) y se volvió a purgar el sistema a baja temperatura. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas, tras lo cual se diluyó con AcOEt y se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de HCl (1M), LiCl (1,5%), NaHCO<sub>3</sub> (5%) y salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a presión reducida para obtener un residuo que se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt (80:20, 70:30 y 50:50), para obtener el alquino **9** (22,5 mg, 62%) como un aceite de color amarillento.

15

Datos espectroscópicos de **9** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros):  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.43 (s ancho, 9H,  $\text{CMe}_3$  de los dos diastereoisómeros), 1.60 (dos d,  $J = 6.3$  Hz, 1.5H cada uno,  $\text{Me-3}''''$  de cada diastereoisómero), 1.87-1.98 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{-3}$ ), 2.50 (m, 4H,  $\text{H}_2\text{-2}$  y  $\text{H}_2\text{-4}$ ), 2.84 y 2.89 (dos dd,  $J = 17.5, 11.5$  Hz, 0.5H cada uno,  $\text{H-4}''''$  de cada diastereoisómero), 3.19 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{-1}''$ ), 3.30 (dd,  $J = 17.4, 3.5$  Hz, 1H,  $\text{H}^1\text{-4}''''$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 4.71-4.82 (m, 1H,  $\text{H-3}''''$ ), 4.96 (dt,  $J = 7.3, 6.0$  Hz, 1H,  $\text{H-2}''$ ), 7.14 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H,  $\text{H-3}'$  y  $\text{H-5}'$ ), 7.30 (dd,  $J = 8.2, 1.4$  Hz, 2H,  $\text{H-2}'$  y  $\text{H-6}'$ ), 8.45 (s, 1H,  $\text{H-6}''''$ ), 8.56 (m, 1H, NH), 12.76 (s, 1H, OH).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 18.9 (C-4), 20.7 ( $\text{Me-3}''''$ ), 23.9 (C-3), 28.0 ( $\text{CMe}_3$ ), 32.3 (C-4'''), 32.9 (C-2), 38.0 (C-1''), 51.6 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 54.5 (C-2''), 75.8 (C-3'''), 81.3 (C-6), 82.5 ( $\text{CMe}_3$ ), 88.8 (C-5), 110.1 (C-8a), 120.8 (C-7'''), 122.3 (C-4'), 123.1 (C-5'''), 129.4 (C2' y C-6'), 131.5 (C-3' y C-5'), 136.0 (C-1'), 139.0 (C-6'''), 140.6 (C-4a), 159.1 (C-8'''), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'''), 170.2 (C-3'''), 173.6 (C-1). EMAR (TOF  $\text{ESI}^+$ ): calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  584.2046, encontrado 584.2029.



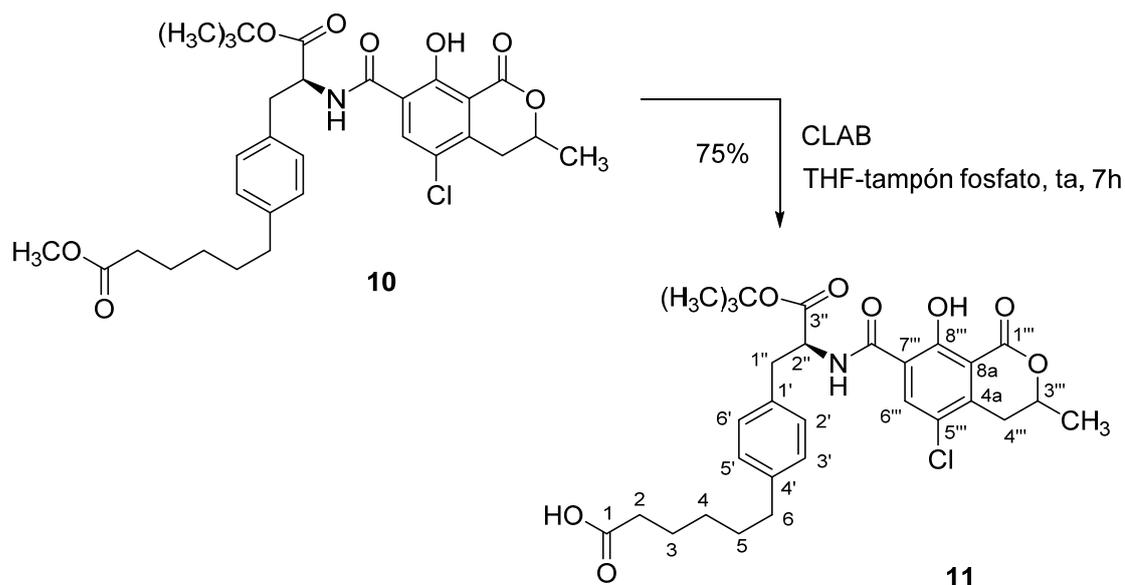
15

Preparación de 6-(4-(3-(terc-butoxi)-2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-oxopropil)fenil)hexanoato de metilo (**10**). Una disolución del alquino **9** (17,6 mg, 0,03 mmol) y  $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$  (4,2 mg,  $4,5 \cdot 10^{-3}$  mmol, 0,15 equiv) en THF anhidro (1,3 mL) contenida en un reactor tiny Büchi se purgó con hidrógeno. La presión de hidrógeno se ajustó a 4 atm y se mantuvo con agitación a temperatura durante 28 horas. A continuación, se venteó el reactor y la mezcla de reacción se

20

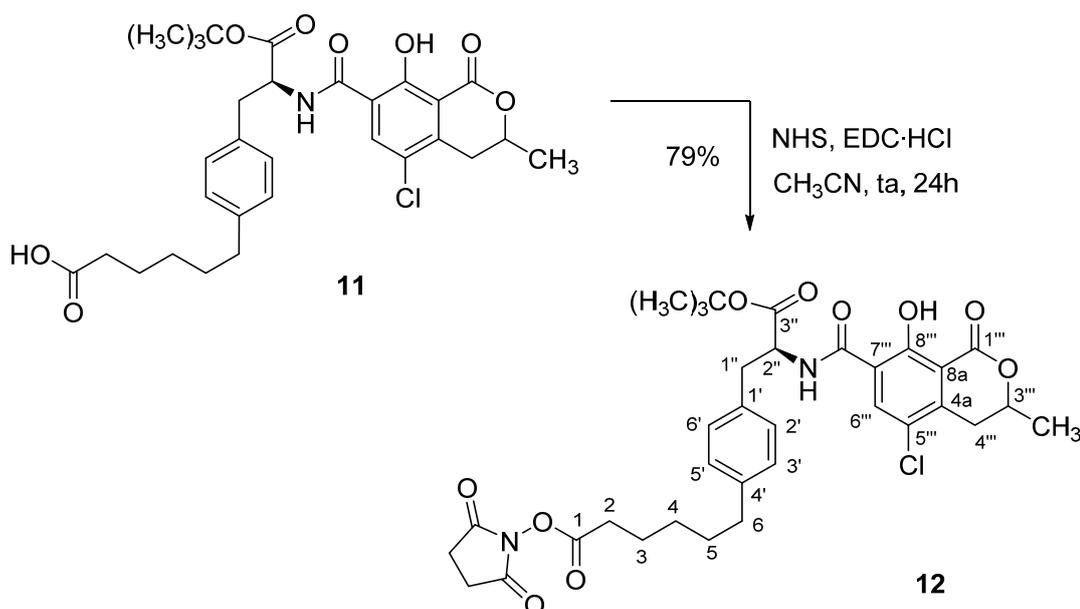
concentró a sequedad a vacío para obtener un residuo que se purificó por cromatografía de columna, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt (90:10, 80:20 y 60:40) para obtener el compuesto **10** (13,4 mg, 76%) como un aceite amarillento.

- 5 Datos espectroscópicos de **10** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros):  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.31-1.38 (m, 2H,  $\text{H}_{2-4}$ ), 1.42 (s ancho, 9H,  $\text{CMe}_3$  de ambos diastereoisómeros), 1.54-1.71 (m, 4H,  $\text{H}_{2-3}$ ,  $\text{H}_{2-5}$ ), 1.60 (dos d,  $J = 6.2$  Hz, 1.5H cada uno,  $\text{Me-3}'''$  de cada diastereoisómero), 2.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{2-2}$ ), 2.57 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_{2-6}$ ), 2.83 y 2.88 (dos dd,  $J = 17.4$ , 11.6, 0.5H cada uno,  $\text{H-4}'''$  de cada diastereoisómero), 3.17 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_{2-1}''$ ), 3.29 (dd,  $J = 17.4$ , 3.5 Hz, 1H,  $\text{H}'-4''$ ), 3.66 (s, 3H, OMe), 4.69-4.82 (m, 1H,  $\text{H-3}'''$ ), 4.94 (dt,  $J = 7.3$ , 6.0 Hz, 1H,  $\text{H-2}''$ ), 7.03-7.16 (m, 4H,  $\text{H-2}'$ ,  $\text{H-3}'$ ,  $\text{H-5}'$  y  $\text{H-6}'$ ), 8.46 (s, 1H,  $\text{H-6}'''$ ), 8.54 (m, 1H, NH), 12.73 (s, 1H, OH).  $^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 20.7 ( $\text{Me-3}'''$ ), 24.8 (C-5), 28.0 ( $\text{CMe}_3$ ), 28.7 (C-4), 31.0 (C-3), 32.3 (C-4'''), 34.0 (C-2), 35.3 (C-6), 37.8 (C-1''), 51.4 (OMe), 54.7 (C-2''), 75.8 (C-3'''), 82.2 ( $\text{CMe}_3$ ), 110.0 (C-8a), 121.0 (C-7'''), 123.0 (C-5'''), 128.4 (C-2' y C-6'), 129.4 (C-3' y C-5'), 133.5 (C-1'), 139.0 (C-6'''), 140.5 (C-4a), 141.1 (C-4'), 159.1 (C-8'''), 162.1 (CONH), 169.8 (C-1'''), 170.5 (C-3'''), 174.2 (C-1). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{ClNO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  588.2359, encontrado 588.2358.



Preparación del ácido 6-(4-(3-(*tert*-butoxi)-2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-oxopropil)fenil)hexanoico (**11**). Una suspensión del éster metílico **10** (13,4 mg, 0,023 mmol) y lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina acrílica macroporosa (Novozyme 435, 26,4 mg) en THF (160  $\mu$ L) en una  
 5 disolución tampón fosfato con pH=7,4 (630  $\mu$ L) se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 7 horas, tras lo cual se filtró y la resina y el reactor se lavaron con agua y AcOEt. La fase acuosa se acidificó con una disolución acuosa 1M de HCl hasta pH=2 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a sequedad a presión reducida  
 10 para obtener un residuo aceitoso que se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (100:0, 95:5 y 90:10), para obtener el ácido **11** (9,9 mg, 75%) como un aceite amarillento.

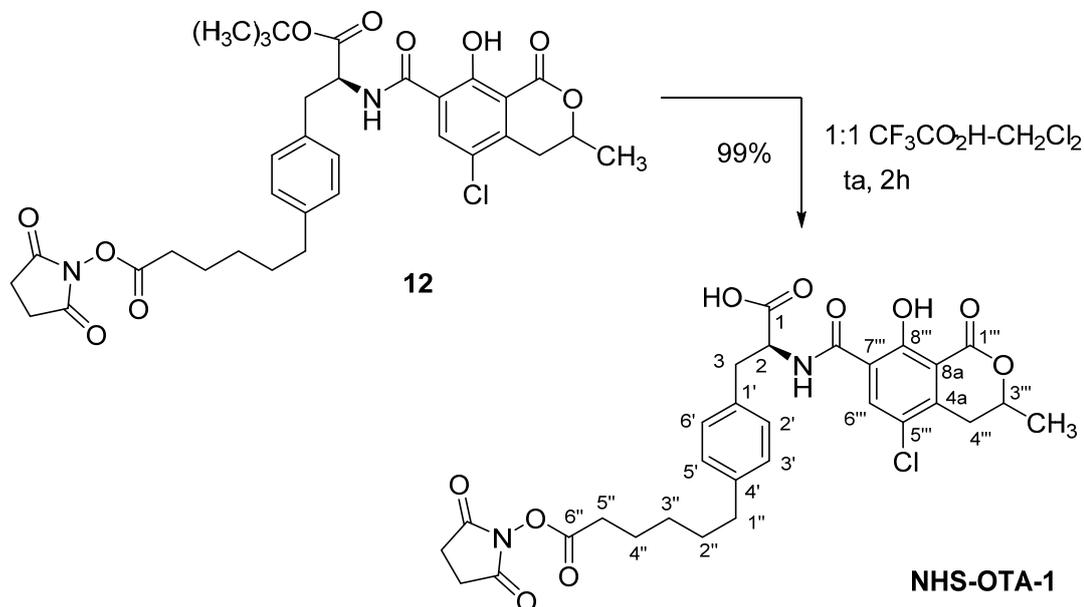
Datos espectroscópicos de **11** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.31-1.37 (m, 2H, H<sub>2</sub>-4), 1.43 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>), 1.54-1.70 (m,  
 15 4H, H<sub>2</sub>-3, H<sub>2</sub>-5), 1.60 (dos d,  $J = 6.2$  Hz, 1.5H cada uno, Me-3'' de cada diastereoisómero), 2.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>-2), 2.57 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>-6), 2.78-2.92 (m, 1H, H-4'''), 3.17 (m, 2H, H<sub>2</sub>-1''), 3.29 (dd,  $J = 17.4, 3.3$  Hz, 1H, H'-4'''), 4.68-4.82 (m, 1H, H-3'''), 4.88-5.00 (m, 1H, H-2''), 7.02-7.16 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' y H-6'), 8.45 (s, 1H, H-6'''), 8.56 (m, 1H, NH), 12.73 (s ancho, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125  
 20 MHz):  $\delta$  (ppm) 20.7 (Me-3'''), 24.5 (C-3), 28.0 (CMe<sub>3</sub>), 28.4 (C-4), 30.9 (C-5), 32.3 (C-4'''), 33.8 (C-2), 35.2 (C-6), 37.8 (C-1''), 54.7 (C-2''), 75.9 (C-3'''), 82.3 (CMe<sub>3</sub>), 110.0 (C-8a), 121.0 (C-7'''), 123.0 (C-5'''), 128.4 (C-2' y C-6'), 129.4 (C-3' y C-5'), 133.5 (C-1'), 139.0 (C-6'''), 140.6 (C-4a), 141.1 (C-4'), 159.1 (C-8'''), 162.2 (CONH), 169.8 (C-1'''), 170.5 (C-3''), 179.3 (CO<sub>2</sub>H). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NCIO<sub>8</sub>  
 25 [M+H]<sup>+</sup> 574.2202, encontrado 574.2220.



Preparación de 6-(4-(3-(*terc*-butoxi)-2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-oxopropil)fenil)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**12**). Una disolución del ácido **11** (10,2 mg, 0,018 mmol), NHS (2,2 mg, 0,019 mmol, 1,1 equiv) y EDC·HCl (3,7 mg, 0,019 mmol, 1,1 equiv) en CH<sub>3</sub>CN anhidro (1,0 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se diluyó con AcOEt y se lavó sucesivamente con agua, una disolución acuosa al 5% de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. Tras evaporar a sequedad, el residuo obtenido se pasó a través de una pequeña columna de gel de sílice, empleando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente, para obtener en éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **12** (9,6 mg, 79%) como un aceite amarillento.

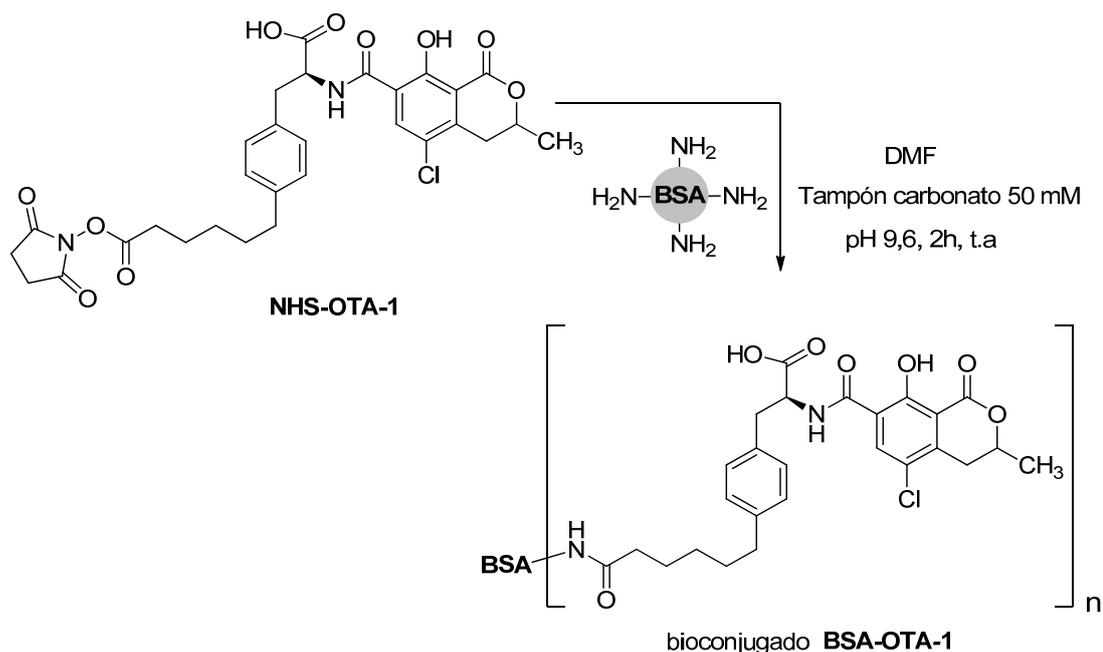
Datos espectroscópicos de **12** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ (ppm) 1.42 (s ancho, 9H, CMe<sub>3</sub> de ambos diastereoisómeros), 1.43-1.49 (m, 2H, H<sub>2</sub>-5), 1.58-1.67 (m, 2H, H<sub>2</sub>-4), 1.60 (dos d, 1.5H cada uno, *J* = 6.4, Me-3''' de cada diastereoisómero), 1.77 (quint, *J* = 7.6 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-3), 2.59 (m, 4H, H<sub>2</sub>-2 y H<sub>2</sub>-6), 2.79-2.90 (m, 5H, H-4''', COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.11-3.22 (m, 2H, H<sub>2</sub>-1''), 3.29 (dd, *J* = 17.4, 3.5 Hz, 1H, H-4'''), 4.69-4.81 (m, 1H, H-3'''), 4.89-4.97 (m, 1H, H-2''), 7.06-7.16 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' y H-6'), 8.45 (s, 1H, H-6'''), 8.54 (m, 1H, NH), 12.73 (s ancho, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ (ppm) 20.7 (Me-3'''), 24.4 (C-3), 25.6 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 28.0 (CMe<sub>3</sub>), 28.4 (C-4), 30.8 (C-5), 30.9 (C-2), 32.3 (C-4'''), 35.2 (C-6), 37.8 (C-1''), 54.7 (C-2''), 75.9 (C-3'''), 82.2 (CMe<sub>3</sub>), 110.0 (C-8a), 121.0 (C-7'''), 123.0 (C-5'''), 128.4 (C-2' y C-6'), 129.5 (C-3' y C-5'), 133.6 (C-1'), 139.0 (C-6'''), 140.5

(C-4a), 140.9 (C-4'), 159.1 (C-8'''), 162.1 (CONH), 168.6 (C-1), 169.1 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 169.8 (C-1'''), 170.5 (C-3'').



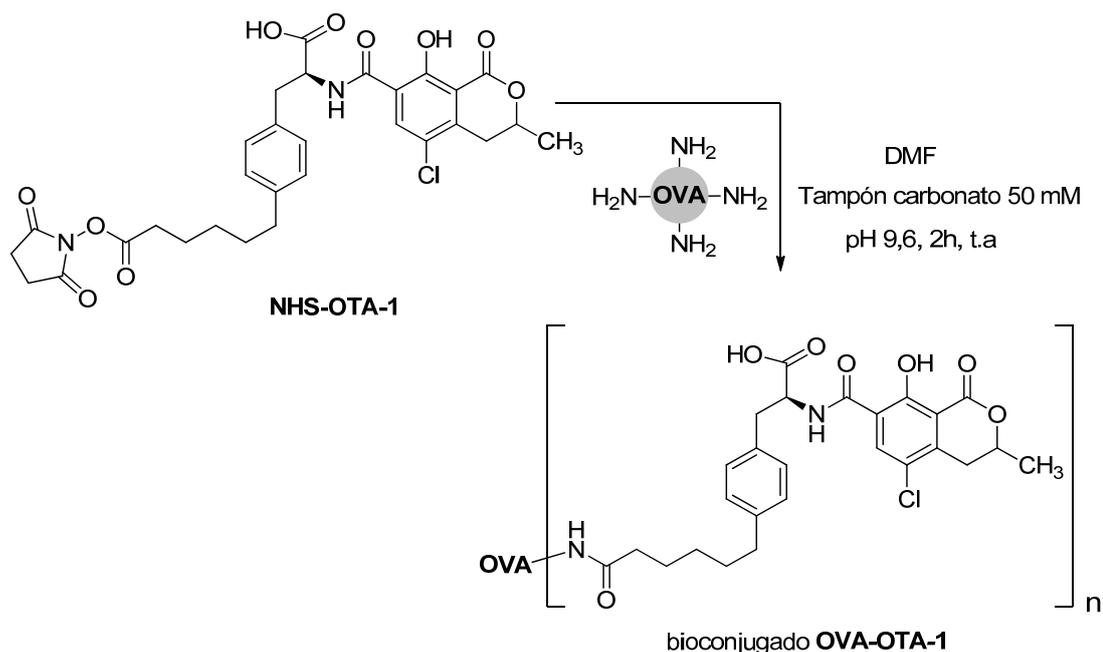
Preparación del ácido 2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-(4-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)fenil)propanoico (Éster de *N*-hidroxisuccimidilo del hapteno OTA-1, **NHS-OTA-1**). Ácido trifluoroacético (370  $\mu$ L, 4,8 mmol, 370 equiv) se añadió gota a gota sobre una disolución del éster *tert*-butílico **12** (9,0 mg, 0,013 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (760  $\mu$ L) y la mezcla resultante se mantuvo con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras esto, la mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida para proporcionar el éster **NHS-OTA-1** (7,9 mg, 99%) como un aceite de aspecto resinoso y color parduzco.

Datos espectroscópicos de **NHS-OTA-1** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.42 (m, 2H, H<sub>2</sub>-2''), 1.57-1.68 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3''), 1.75 (m, 2H, H<sub>2</sub>-4''), 1.60 (dos d, 1.5H cada uno, *J* = 6.4, Me-3''' de cada diastereoisómero), 2.59 (m, 4H, H<sub>2</sub>-1'' y H<sub>2</sub>-5''), 2.78-2.91 (m, 5H, H-4''', COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.16-3.34 (m, 3H, H<sub>2</sub>-3 y H'-4'''), 4.77 (m, 1H, H-3'''), 5.00-5.04 (m, 1H, H-2), 7.06-7.18 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' y H-6'), 8.42 (m, 1H, H-6'''), 8.51 y 8.58 (dos m, 0.5H cada uno, NH de cada diastereoisómero). EMAR (TOF ESI+): calculado para C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup> 615.1740, encontrado 615.1732.

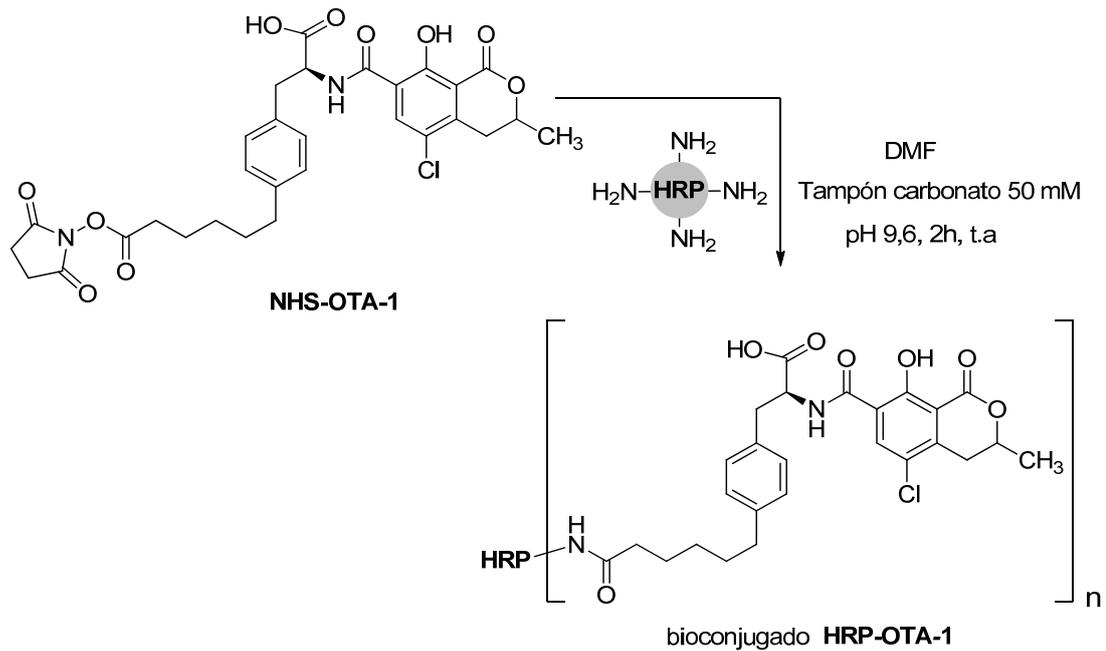


1.2. *Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-1 con BSA (BSA-OTA-1).* 100  $\mu\text{L}$  de la disolución del éster activo NHS-OTA-1 (50 mM en DMF) obtenida en la reacción anterior se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 0,9 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. La reacción de conjugación se incubó durante 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los conjugados se purificaron por exclusión molecular en 3 columnas cromatográficas HiTrap Desalting Columns de 5 mL cada una, acopladas en serie, utilizando como tampón de elución fosfato sódico 100 mM, pH 7,4. Finalmente, tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que contenían el bioconjugado de BSA se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL con tampón de elución y se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

Para determinar la carga hapténica ( $n$ ) obtenida en el conjugado, una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del bioconjugado BSA-OTA-1 purificado se dializó (diálisis contra 5 L de agua desionizada con al menos 2 a 3 cambios de agua cada 24 h a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ); finalmente, el producto dializado se liofilizó y el número de moléculas de hapteno (OTA-1) conjugadas por molécula de BSA se determinó mediante MALDI-TOF-MS ( $n = 15,2$ , ver Tabla 1, entrada 1).



- 1.3. Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-1 con OVA (**OVA-OTA-1**). A partir de una disolución 50 mM del hapteno activado NHS-OTA-1 en DMF, se tomaron 90  $\mu\text{L}$  y se añadieron lentamente y con agitación constante a un volumen de 1,7 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Después de 2 h de reacción en agitación suave y a temperatura ambiente, se procedió a la purificación del bioconjugado como se ha descrito anteriormente para el conjugado de BSA. Las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0,01% (v/v) y, se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Una alícuota del conjugado OVA-OTA-1 recién obtenido se dializó y liofilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número de moléculas de hapteno (OTA-1) acoplados a la proteína mediante MALDI-TOF-MS ( $n = 9,6$ , ver Tabla 1, entrada 2).



1.4. Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-1 con HRP (**HRP-OTA-1**). A partir de una disolución 5 mM del hapteno activado NHS-OTA-1 en DMF, se tomaron 80  $\mu\text{L}$  y se añadieron lentamente y con agitación constante y suave sobre 0,9 mL de una disolución de HRP a una concentración de 2,5 mg/mL en tampón carbonato 50 mM, pH 7,4. La reacción de conjugación se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el bioconjugado se purificó siguiendo el procedimiento descrito previamente para los bioconjugados de BSA y OVA, y se llevó a una concentración de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenaron a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Una alícuota del conjugado HRP-OTA-1 recién obtenido se dializó y liofilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número de moléculas de hapteno (OTA-1) acoplados a la proteína mediante MALDI-TOF-MS ( $n = 1,1$ , ver Tabla 1, entrada 3).

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

	$RM_0$	$m/z$ proteína referencia	$m/z$	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/hapteno$	$n$
1 BSA-OTA-1	24	6.380	73.988	7.608	500	15,2
2 OVA-OTA-1	10	2.397 <sup>#</sup>	28.235 <sup>#</sup>	4.838	500	9,6
3 HRP-OTA-1	8	43.884	44.437	553	500	1,1

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

$n$ : relación molar hapteno/proteína obtenida para cada conjugado

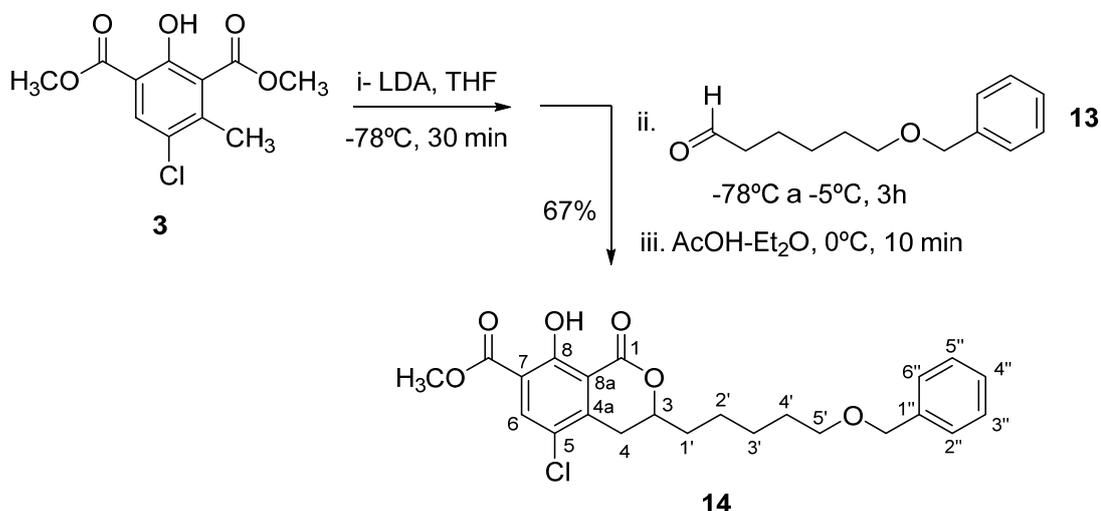
$\Delta(m/z)$ :  $(m/z$  conjugado)  $- (m/z$  proteína de referencia)

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

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

**Ejemplo 2:** Preparación de bioconjugados de fórmula (I) para  $T = R-II$ ,  $L = -CH_2CH_2CH_2CH_2-$ ,  $Z = -(C=O)NH-$  y  $P = BSA, OVA$  y  $HRP$ .

2.1. Preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno OTA-2 (**NHS-OTA-2**).



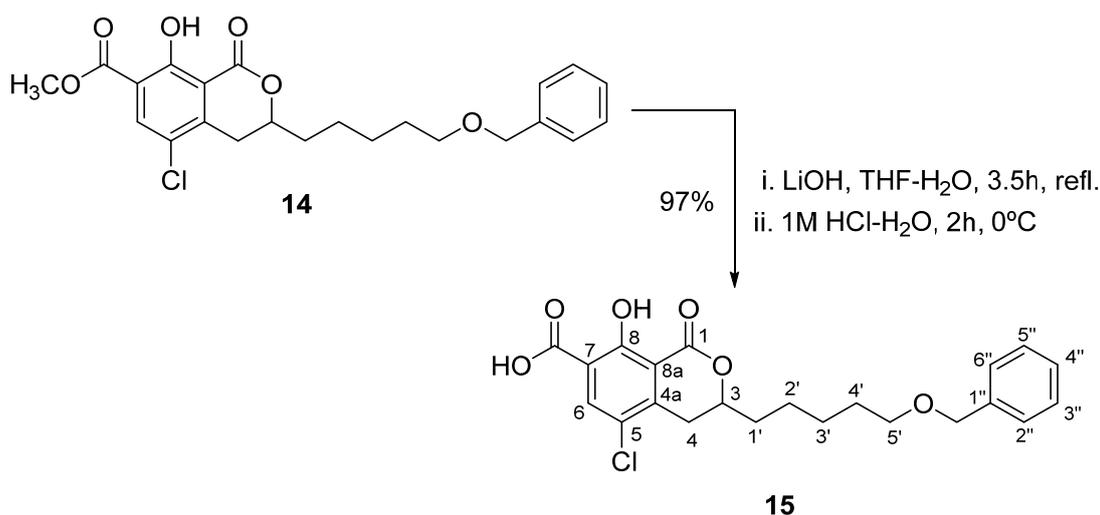
5

Preparación de 3-(5-(benziloxi)pentil)-5-cloro-8-hidroxi-1-oxoisocromano-7-carboxilato de metilo (**14**). Una disolución del diéster **3** (117,0 mg, 0,45 mmol) en THF anhidro (280  $\mu\text{L}$ ) se añadió gota a gota sobre una disolución de LDA en THF, generada a partir de diisopropilamina (185  $\mu\text{L}$ , 1,25 mmol, 2,75 equiv) y 1,6 M BuLi en hexano (710  $\mu\text{L}$ , 0,14 mmol, 2,5 equiv) en THF (1,4 mL), a  $-78^\circ\text{C}$  bajo nitrógeno. La mezcla se mantuvo a la misma temperatura durante 30 minutos y a continuación se añadió una disolución

10

del aldehído **13** (150 mg, 0,73 mmol, 1,6 equiv) en THF anhidro (150  $\mu$ L). La mezcla de reacción se agitó a  $-78$   $^{\circ}$ C durante 15 minutos y luego se dejó que se calentara lentamente hasta  $-5^{\circ}$ C (aproximadamente 3 horas). Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se trató con una mezcla 1:2 de AcOH-Et<sub>2</sub>O y se agitó durante 10 minutos a  $0^{\circ}$ C, se diluyó con AcOEt y se lavó con agua, salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro para obtener, tras evaporar el disolvente a vacío, un residuo que se purificó por cromatografía, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt-AcOH (100:0:0,3, 95:5:0,3 y 85:15:0,3) para obtener el compuesto **14** (109,0 mg, 67%) como aceite amarillento.

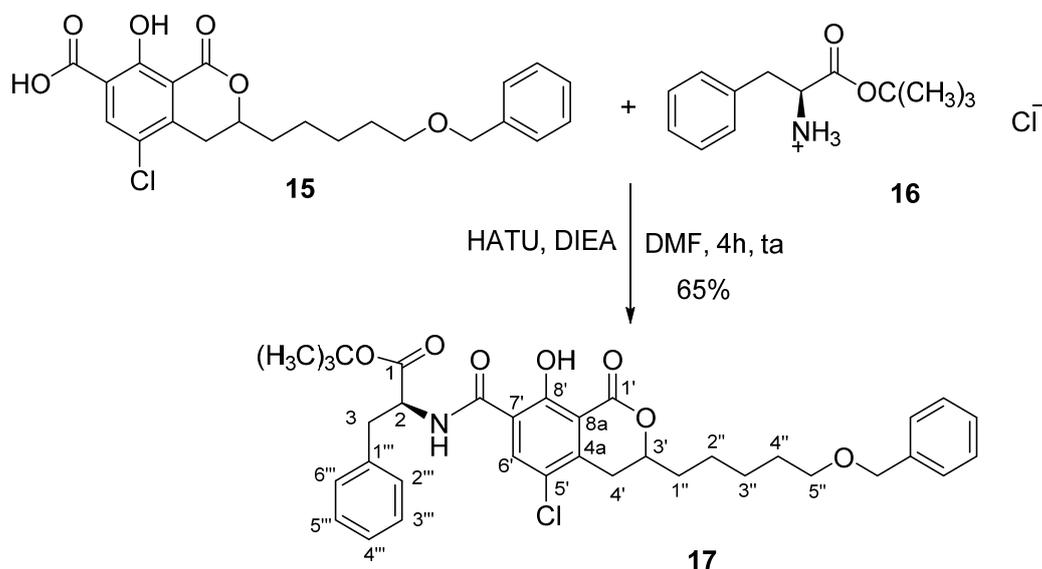
Datos espectroscópicos de **14** (una mezcla racémica): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.30-1.93 (m, 8H, H<sub>2</sub>-1', H<sub>2</sub>-2', H<sub>2</sub>-3' y H<sub>2</sub>-4'), 2.77 (dd,  $J$  = 17.3, 11.7 Hz, 1H, H-4), 3.16 (dd,  $J$  = 17.3, 3.4 Hz, 1H, H'-4), 3.43 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 3H, H<sub>2</sub>-5'), 3.89 (s, 3H, OMe), 4.44 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.45-4.58 (m, 1H, H-3), 6.98-7.46 (m, 5H, Ph), 8.05 (s, 1H, H-6), 12.14 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 24.5 (C-2'), 25.9 (C-3'), 29.5 (C-4'), 30.9 (C-4), 34.6 (C-1'), 52.5 (OMe), 70.0 (C-5'), 72.8 (OCH<sub>2</sub>), 78.5 (C-3), 111.4 (C-7), 118.2 (C-8a), 121.7 (C-5), 127.5 (C-4''), 127.6 (C-2''' y C-6'''), 128.3 (C-3''' y C-5'''), 137.9 (C-1'''), 138.5 (C-6), 142.3 (C-4a), 161.0 (C-8), 165.0 (C-1), 167.9 (CO<sub>2</sub>). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>Cl O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 433.1412, encontrado 433.1415.



20

*Preparación del ácido 3-(5-(benziloxi)pentil)-5-cloro-8-hidroxi-1-oxoisocromano-7-carboxílico (15).* Una disolución de LiOH·H<sub>2</sub>O (135,0 mg, 3,21 mmol, 10 equiv) en agua (1,40 mL) se añadió sobre una disolución de la dihidroisocumarina **14** (139,0 mg,

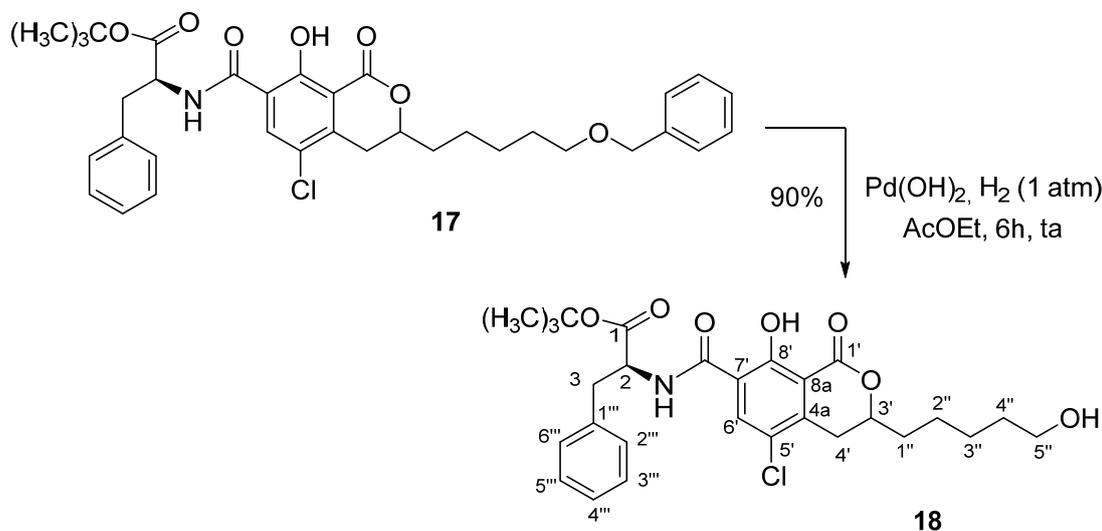
- 0,32 mmol) en THF anhidro (1,30 mL) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3,5 horas. A continuación la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se trató con una disolución acuosa 1M de HCl (5,80 mL, 5,80 mmol, 18 equiv), se agitó a 0 °C durante 2 horas, se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a sequedad a presión reducida para obtener el ácido **15** (130,5 mg, 97%) como un semisólido amarillento, cuyo RMN de <sup>1</sup>H muestra que tiene una pureza suficientemente elevada para ser utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 10 Datos espectroscópicos de **15** (una mezcla racémica): <sup>1</sup>H-RMN (MeOD, 300 MHz): δ (ppm) 1.42-1.91 (m, 8H, H<sub>2</sub>-1', H<sub>2</sub>-2', H<sub>2</sub>-3' y H<sub>2</sub>-4'), 2.87 (dd, *J* = 17.3, 11.7 Hz, 1H, H-4), 3.21-3.29 (m, 1H, H'-4), 3.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-5'), 4.50 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.56 (m, 1H, H-3), 7.21-7.37 (m, 5H, Ph), 8.12 (s, 1H, H-6). <sup>13</sup>C-RMN (MeOD, 75 MHz): δ (ppm) 25.8 (C-2'), 27.2 (C-3'), 30.7 (C-4'), 32.5 (C-4), 35.7 (C-1'), 71.4 (C-5'), 74.0 (OCH<sub>2</sub>), 79.7 (C-3), 114.0 (C-7), 118.6 (C-8a), 122.8 (C-5), 128.8 (C-4''), 129.0 (C-2'' y C-6''), 129.5 (C-3'' y C-5''), 138.2 (C-1'''), 140.0 (C-6), 145.4 (C-4a), 163.0 (C-8), 167.5 C-1), 169.8 (CO<sub>2</sub>H). EMAR (TOF ESI+): calculado para C<sub>22</sub>H<sub>24</sub> ClO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 419.1256, encontrado 419.1251.



- 20 *Preparación de 2-(3-(5-(benziloxy)pentil)-5-cloro-8-hidroxi-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-fenilpropanoato de terc-butilo (17)*. Una disolución de HATU (123,5 mg, 0,33 mmol, 1,5 equiv) en DMF anhidra (1,5 mL) y DIEA (80 µL, 0,44 mmol, 2 equiv) se

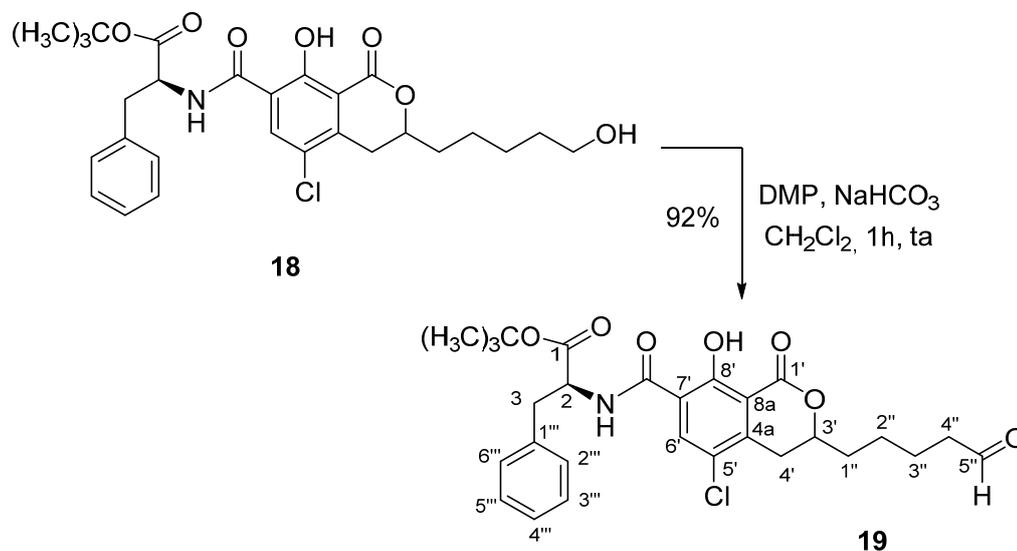
añadieron sobre una disolución del ácido **15** (91,0 mg, 0,22 mmol) en DMF anhidra (1,5 mL) bajo nitrógeno y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se añadió una disolución del clorhidrato **16** (108 mg, 0,44 mmol, 2 equiv) y DIEA (80  $\mu$ L, 0,44 mmol, 2 equiv) en DMF anhidra (1,1 mL) y se agitó a la misma temperatura durante 4 horas, se diluyó la mezcla de reacción con AcOEt y se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de HCl (1M), LiCl (1,5%), NaHCO<sub>3</sub> (5%) y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt-AcOH (100:0:0,3, 90:10:0,3, y 80:20:0,3) para obtener la amida **17** como un aceite amarillento (87 mg, 65%).

Datos espectroscópicos de **17** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.28-1.91 (m, 8H, H<sub>2</sub>-1'', H<sub>2</sub>-2'', H<sub>2</sub>-3'', H<sub>2</sub>-4''), 1.36 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>), 2.69-2.86 (m, 1H, H-4'), 3.08-3.23 (m, 3H, H'-4' y H<sub>2</sub>-3), 3.43 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>-5''), 4.44 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.47-4.59 (m, 1H, H-3'), 4.86-4.96 (m, 1H, H-2), 7.04-7.32 (m, 10H, Ph y PhBn), 8.39 (s, 1H, H-6'), 8.50 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, NH), 12.66 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 24.5 (C-2''), 25.9 (C-3''), 27.9 (CMe<sub>3</sub>), 29.5 (C-4''), 30.6 (C-4'), 34.6 (C-1''), 38.1 (C-3), 54.6 (C-2), 70.0 (C-5''), 72.9 (OCH<sub>2</sub>), 79.2 (C-3'), 82.2 (CMe<sub>3</sub>), 110.2 (C-8a), 120.8 (C-7'), 123.0 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 127.5 (C-4 PhBn), 127.6 (C-2 y C-6 PhBn), 128.3 (C-3''' y C-5'''), 129.0 (C-3 y C-5 PhBn), 129.5 (C-2''' y C-6'''), 136.3 (C-1'''), 138.5 (C-1 PhBn), 138.9 (C-6'), 140.6 (C-4a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.3 (C-1). EMAR (TOF ESI+): calculado para C<sub>35</sub>H<sub>41</sub>ClNO<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 622.2566, encontrado 622.2570.



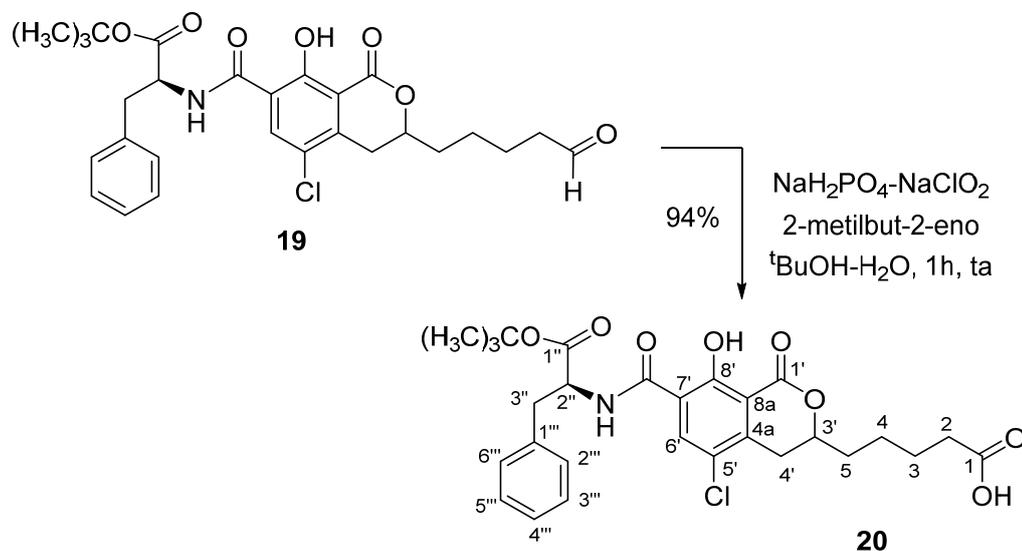
Preparación de 2-(5-cloro-8-hidroxi-3-(5-hidroxipentil)-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-fenilpropanoato de terc-butilo (**18**). Una suspensión de Pd(OH)<sub>2</sub> (44 mg, 0,04 mmol, 0,3 equiv) y del éter bencílico **17** (85 mg, 0,14 mmol) en AcOEt (4,8 mL) se purgó con repetidos ciclos de vacío-hidrógeno y posteriormente se agitó vigorosamente bajo una presión de H<sub>2</sub> de 1 atm (globo) a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre una pequeña columna de gel de sílice, utilizando AcOEt para lavar, y el filtrado y las aguas de lavado se concentraron a sequedad para proporcionar el alcohol **18** (65 mg, 90%) como un aceite, cuyo RMN de <sup>1</sup>H muestra la presencia de un pequeño porcentaje (5-6%) del producto de hidrogenolisis del enlace C-Cl.

Datos espectroscópicos de **18** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 1.40-1.98 (m, 8H, H<sub>2</sub>-1'', H<sub>2</sub>-2'', H<sub>2</sub>-3'', H<sub>2</sub>-4''), 1.42 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>), 2.78-2.94 (dos dd, *J* = 17.4, 11.8 Hz, 1H, H-4' de cada diastereoisómero), 3.14-3.33 (m, 3H, H-4' y H<sub>2</sub>-3), 3.67 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-5''), 4.51-4.69 (m, 1H, H-3'), 4.96 (m, 1H, H-2), 7.10-7.35 (m, 5H, Ph), 8.44 (s, 1H, H-6'), 8.50-8.63 (dos d, *J* = 7.4 Hz, 0.5H cada uno, NH de cada diastereoisómero), 12.72 (dos s, 0.5H cada uno, OH de cada diastereoisómero). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) 24.5 (C-2''), 25.5 (C-3''), 27.9 (CMe<sub>3</sub>), 30.6 (C-4'), 32.4 (C-4''), 34.6 (C-1''), 38.1 (C-3), 54.6 (C-2), 62.6 (C-5''), 79.3 (C-3'), 82.3 (CMe<sub>3</sub>), 110.1 (C-8a), 120.8 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' y C-6'''), 129.5 (C-3''' y C-5'''), 136.2 (C-1'''), 138.9 (C-6'), 140.6 (C-4a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.4 (C-1). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>ClNO<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 532.2097, encontrado 532.2060.



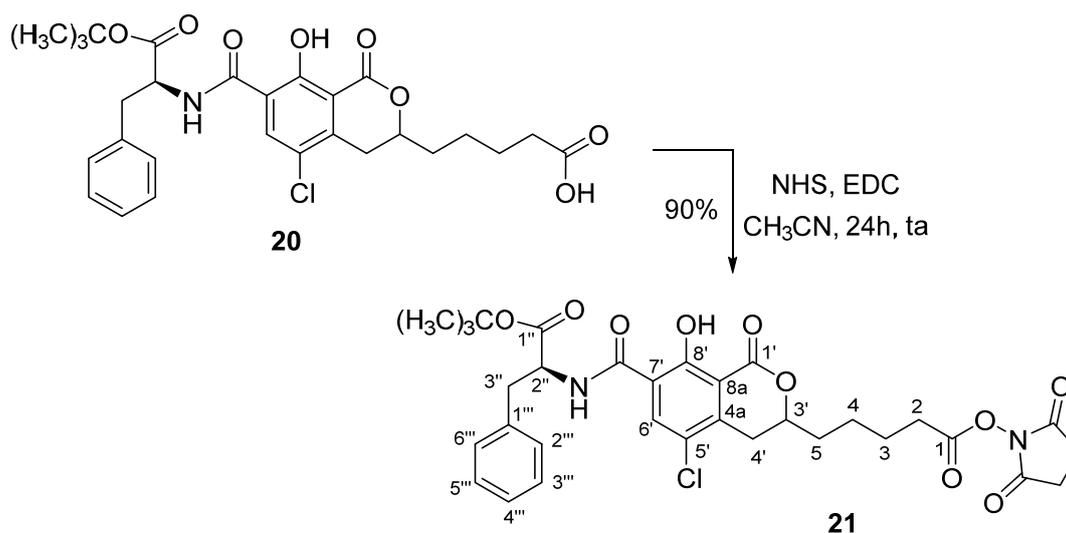
Preparación de 2-(5-cloro-8-hidroxi-1-oxo-3-(5-oxopentil)isocromano-7-carboxamido)-3-fenilpropanoato de terc-butilo (**19**). Una suspensión de Dess–Martin periodinano (DMP) (78,0 mg, 0,18 mmol, 1,5 equiv) y NaHCO<sub>3</sub> (82 mg, 0,98 mmol, 8,0 equiv) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,0 mL) se añadió sobre una mezcla del alcohol **18** (65,0 mg, 0,12 mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (82 mg, 0,98 mmol, 8,0 equiv) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) enfriada a 0 °C. La mezcla resultante se agitó 10 minutos a 0 °C y 1 hora a temperatura ambiente, se diluyó con AcOEt y se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10%), NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a sequedad a presión reducida para obtener el aldehído **19** (59,6 mg, 92%) como un aceite amarillento.

Datos espectroscópicos de **19** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 1.42 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>), 1.48-1.99 (m, 6H, H<sub>2</sub>-1'', H<sub>2</sub>-2'' y H<sub>2</sub>-3''), 2.52 (dt, *J* = 7.0, 1.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-4''), 2.87 (dos dd, *J* = 17.3, 11.7, 0.5H cada uno, H-4' de cada diastereoisómero), 3.14-3.31 (m, 3H, H'-4' y H<sub>2</sub>-3), 4.60 (ddt, *J* = 11.7, 7.7, 4.0 Hz, 1H, H-3'), 4.92-5.01 (dt, *J* = 7.3, 6.1 Hz, 1H, H-2), 7.16-7.32 (m, 5H, Ph), 8.45 (s, 1H, H-6'), 8.56 (dos d, *J* = 7.3 Hz, 0.5H cada uno, NH de cada diastereoisómero), 9.80 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, CHO), 12.69 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) 21.6 (C-3''), 24.3 (C-2''), 27.9 (CMe<sub>3</sub>), 30.6 (C-4'), 34.5 (C-1''), 38.1 (C-3), 43.6 (C-4''), 54.6 (C-2), 79.0 (C-3'), 82.3 (CMe<sub>3</sub>), 110.1 (C-8a), 120.9 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' y C-6'''), 129.5 (C-3''' y C-5'''), 136.3 (C-1'''), 139.0 (C-6'), 140.5 (C-4a), 159.0 (C-8'), 162.3 (CONH), 169.6 (C-1'), 170.4 (C-1), 201.9 (C-5''). EMAR (TOF ESI+): calculado para C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>ClNO<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 530.1940, encontrado 530.1920.



Preparación del ácido 5-(7-((1-(*tert*-butoxi)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamoil)-5-cloro-8-hidroxi-1-oxoisocromano-3-il)pentanoico (**20**). Una disolución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (92,7 mg, 0,67 mmol, 6,0 equiv) y NaClO<sub>2</sub> (40,5 mg, 0,45 mmol, 4 equiv) en agua (620 µL) se adicionó sobre una disolución del aldehído **19** (59,6 mg, 0,11 mmol) y 2-metilbut-2-eno (175 µL, 1,57 mmol, 14 equiv) en <sup>t</sup>BuOH (1,5 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añadió una disolución acuosa 1M de HCl (1,5 mL) y se agitó durante 3 minutos a temperatura ambiente, se diluyó con AcOEt, se lavó con salmuera y se concentró a sequedad a vacío para obtener el ácido **20** (62,6 mg, 94%) como un aceite amarillento.

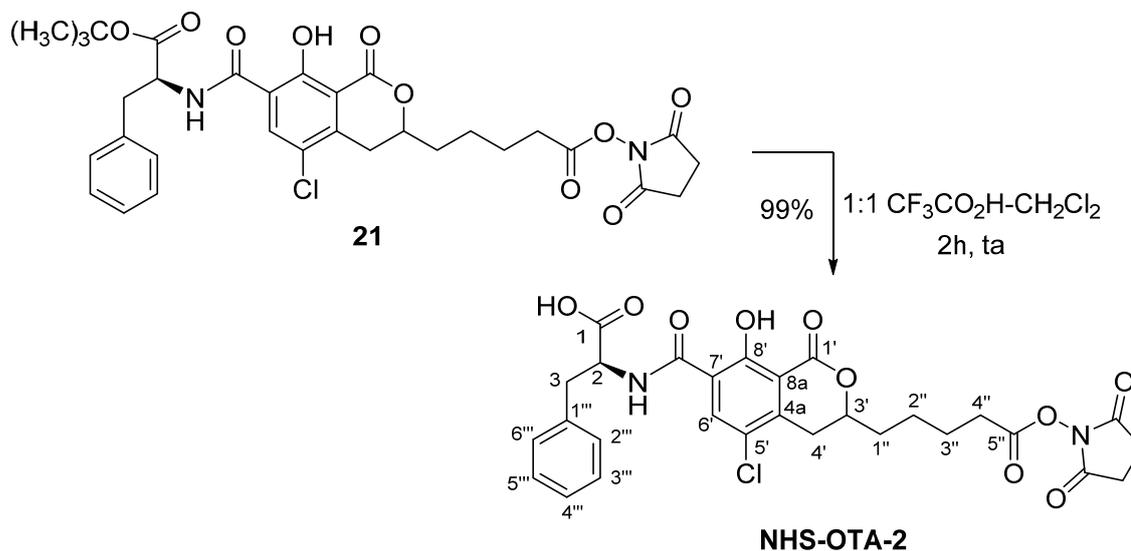
Datos espectroscópicos de **20** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 1.41 (dos s, 4.5H cada uno, CMe<sub>3</sub> de cada diastereoisómero), 1.53-2.00 (m, 6H, H<sub>2</sub>-3, H<sub>2</sub>-4 y H<sub>2</sub>-5), 2.42 (t, *J* = 7.10 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-2), 2.80-2.92 (m, 1H, H-4'), 3.13-3.31 (m, 3H, H'-4' y H<sub>2</sub>-3''), 4.55-4.65 (m, 1H, H-3'), 4.97 (dt, *J* = 7.3, 6.1 Hz, 1H, H-2''), 7.11-7.31 (m, 5H, Ph), 8.44 (s, 1H, H-6'), 8.57-8.62 (m, 1H, NH), 12.71 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) 24.2 (C-4), 27.9 (CMe<sub>3</sub>), 29.6 (C-3), 30.6 (C-4'), 33.6 (C-2), 34.3 (C-5), 38.1 (C-3''), 54.6 (C-2''), 79.0 (C-3'), 82.4 (CMe<sub>3</sub>), 110.1 (C-8a), 120.7 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' y C-6'''), 129.5 (C-3''' y C-5'''), 136.2 (C-1'''), 139.0 (C-6'), 140.6 (C-4a), 159.0 (C-8'), 162.2 (CONH), 169.6 (C-1'), 170.3 (C-1''), 178.6 (C-1). EMAR (TOF ESI+): calculado para C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>ClNO<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 546.1889, encontrado 546.1867.



Preparación de 5-(7-((1-(*tert*-butoxi)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamoil)-5-cloro-8-hidroxi-1-oxoisocromano-3-il)pentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**21**). Una

disolución del ácido **20** (31,8 mg, 0,058 mmol), NHS (7,3 mg, 0,064 mmol, 1,1 equiv) y EDC·HCl (13,4 mg, 0,07 mmol, 1,2 equiv) en CH<sub>3</sub>CN seco (1,6 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas bajo nitrógeno, tras lo cual se diluyó con AcOEt y se lavó sucesivamente con agua, disolución acuosa del 5% de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. Tras secar sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **21** (33,0 mg, 90%) como un aceite.

Datos espectroscópicos de **21** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 1.41 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>), 1.50-1.91 (m, 6H, H<sub>2</sub>-3, H<sub>2</sub>-4 y H<sub>2</sub>-5), 2.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>2</sub>-2), 2.83 (s, 4H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.88-2.94 (m, 1H, H-4'), 3.14-3.24 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3''), 3.27 (dd, *J* = 17.2, 3.3 Hz, H'-4'), 4.54-4.68 (m, 1H, H-3'), 4.90-5.01 (m, 1H, H-2''), 7.12-7.34 (m, 5H, Ph), 8.44 (s, 1H, H-6'), 8.55 (dos dd, *J* = 7.4 Hz, 0.5H cada uno, NH de cada diastereoisómero), 12.69 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) 24.2 (C-4), 25.6 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 27.9 (CMe<sub>3</sub>), 29.6 (C-3), 30.6 (C-2), 30.7 (C-4'), 34.1 (C-5), 38.1 (C-3''), 54.6 (C-2''), 78.9 (C-3'), 82.3 (CMe<sub>3</sub>), 110.1 (C-8a), 120.8 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' y C-6'''), 129.5 (C-3''' y C-5'''), 136.2 (C-1'''), 138.9 (C-6'), 140.5 (C-4a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 168.3 (C-1), 169.1 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 169.6 (C-1'), 170.3 (C-1''). EMAR (TOF ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup> 643.2053, encontrado 643.2050.

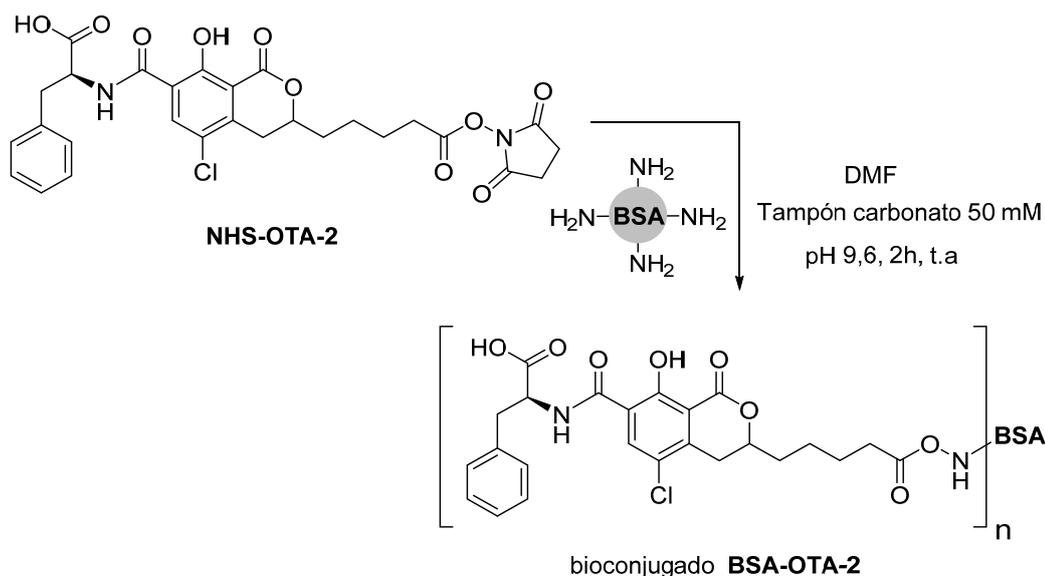


20

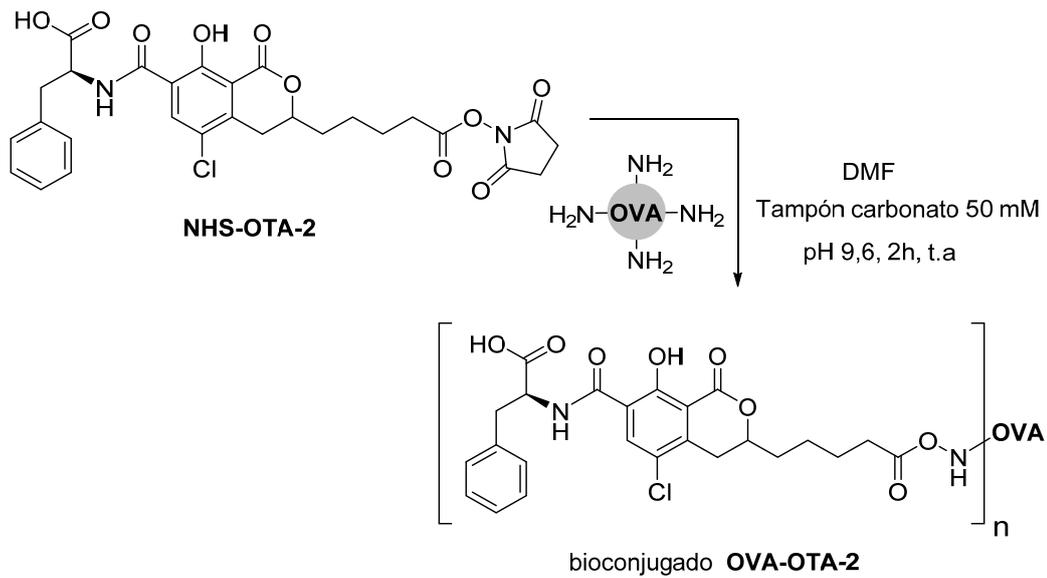
*Preparación del ácido 2-(5-cloro-3-(5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentil)-8-hidroxi-1-oxisocroman-7-carboxamido)-3-fenilpropanoico (Éster de *N*-*

hidroxisuccimidilo del hapteno OTA-2, **NHS-OTA-2**). Una disolución del éster *terc*-butílico **21** (33,0 mg, 0,051 mmol) y  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  (1,5 mL, 19,0 mmol, 370 equiv) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (2,3 mL) se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente bajo nitrógeno. A continuación, los disolventes se eliminaron a sequedad a presión reducida para obtener **NHS-OTA-2** (29,8 mg, 99%) como un residuo de aspecto resinoso y color parduzco.

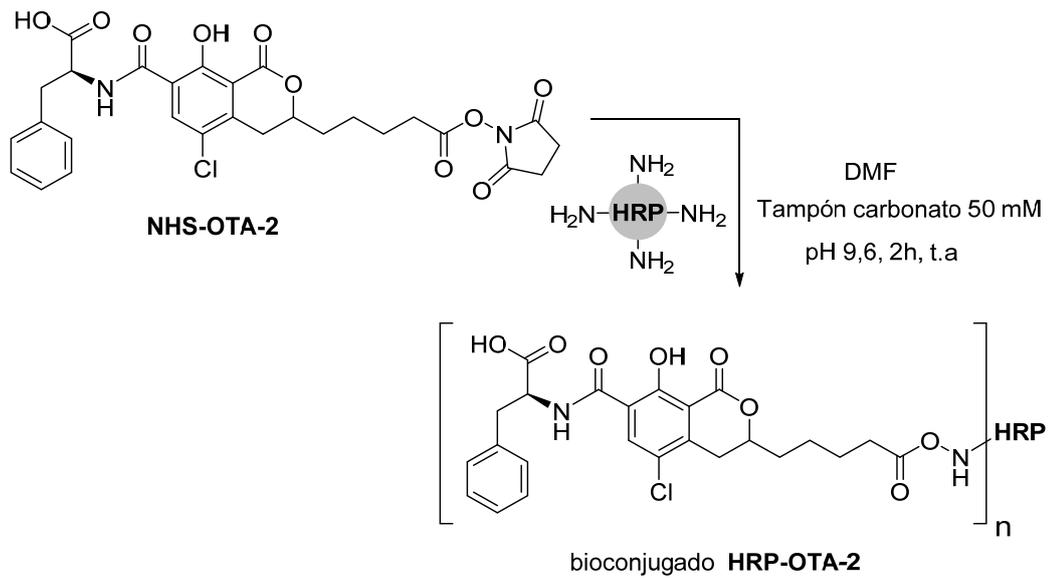
Datos espectroscópicos de **NHS-OTA-2** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros):  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.54-1.93 (m, 6H,  $\text{H}_2$ -1'',  $\text{H}_2$ -2'' y  $\text{H}_2$ -3''), 2.68 (t,  $J = 6.69$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ -4''), 2.85 (s ancho, 4H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.92 (m, 1H, H-4'), 3.17-3.43 (m, 3H,  $\text{H}_2$ -3 y H'-4'), 4.61 (m, 1H, H-3'), 5.03 (m, 1H, H-2), 7.18-7.33 (m, 5H, Ph), 8.39 (s, 1H, H-6'), 8.56 (s ancho, 1H, NH), 12.73 (s ancho, 1H, OH). EMAR (TOF ESI+): calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{ClN}_2\text{O}_{10}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  587.1427, encontrado 587.1425.



2.2. Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-2 con BSA (**BSA-OTA-2**). Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado BSA-OTA-1 a partir de 200  $\mu\text{L}$  de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-OTA-2 y 1,8 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución y se almacenaron a  $-20$   $^{\circ}\text{C}$ . El número de moléculas de OTA-2 conjugadas por cada molécula de BSA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de  $n = 11,8$  (ver Tabla 2, entrada 1).



2.3. *Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-2 con OVA (OVA-OTA-2).* Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado OVA-OTA-1 a partir 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-OTA-2 y 1,9 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0,01% (v/v) y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ . El número de moléculas de OTA-2 conjugadas por cada molécula de OVA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de  $n = 3,1$  (ver Tabla 2, entrada 2).



2.4. Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-2 con HRP (**HRP-OTA-2**). Preparado a partir de 80  $\mu\text{L}$  de una disolución 5 mM del hapteno activado NHS-OTA-2 en DMF y 0,9 mL de una disolución de HRP (2,5 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 7,4. Tras la purificación cromatográfica, las fracciones obtenidas conteniendo el bioconjugado se llevaron a una concentración de 460  $\mu\text{g/mL}$  en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenaron a 4  $^{\circ}\text{C}$ . El número de moléculas de OTA-2 conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de  $n = 0,6$  (ver Tabla 2, entrada 3).

10

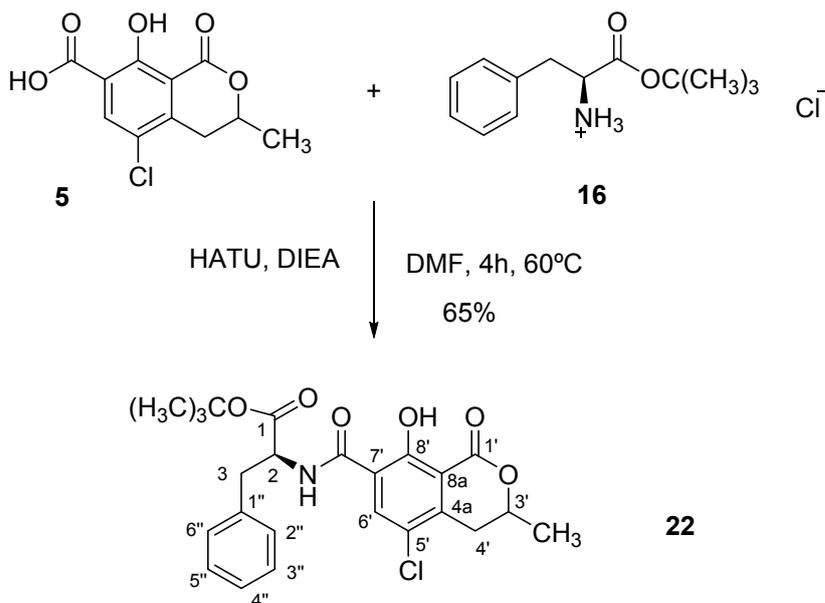
**TABLA 2.** Valores de la carga hapténica de los conjugados proteicos del hapteno OTA-2 determinados por MALDI-TOF-MS

	$RM_0$	$m/z$ proteína referencia	$m/z$	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$n$	
1	BSA-OTA-2	24	66.428	71.982	5.554	472	11,8
2	OVA-OTA-2	8	21.340	22.071	731	472	3,1
3	HRP-OTA-2	8	43.928	44.200	272	472	0,6

$RM_0$ ,  $n$ ,  $\Delta(m/z)$  y  $\Delta m/\text{hapteno}$  tienen el mismo significado que en pie de Tabla 1.

**Ejemplo 3:** Preparación de bioconjugados comparativos basados en el anclaje de la proteína a través del grupo carboxilato de OTA donde **L** = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, **Z** = –(C=O)NH– y **P** = BSA, OVA y HRP.

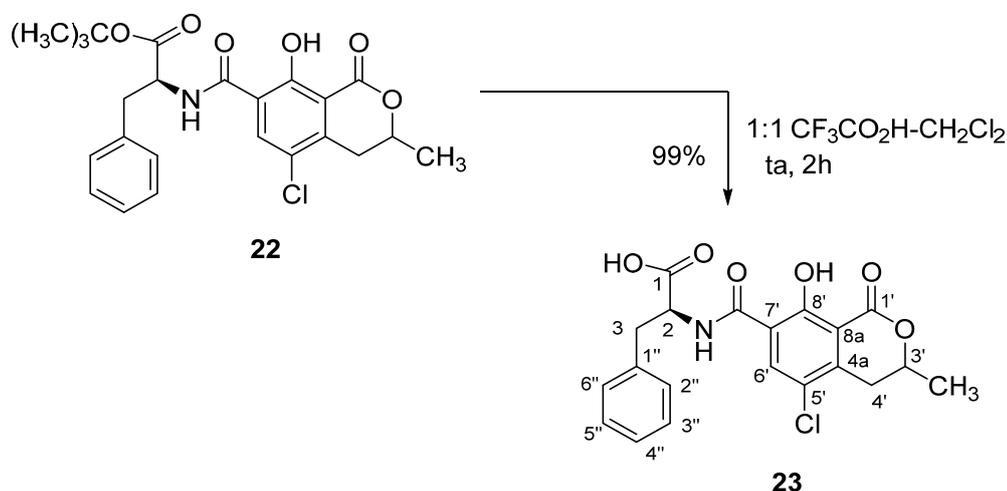
3.1. Preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno OTA-3 (**NHS-OTA-3**).



Preparación de 2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-fenilpropanoato de *tert*-butilo (**22**). A una disolución del ácido **5** (40 mg, 0,16 mmol) en DMF anhidra (1,1 mL) se añadieron una disolución de HATU (91,3 mg, 0,24 mmol, 1,5 equiv) en DMF anhidra (1,1 mL) y DIEA (60 µL, 0,32 mmol, 2 equiv). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y a continuación se añadió una disolución del clorhidrato **16** (82,5 mg, 0,32 mmol, 2 equiv) y DIEA (60 µL, 0,324 mmol, 2 equiv) en DMF anhidra (1,1 mL). Se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, tras lo cual se diluyó la mezcla de reacción con AcOEt y se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de HCl (1M), LiCl (1,5%), NaHCO<sub>3</sub> (5%) y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a sequedad en el rotavapor. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt-AcOH (100:0:0,3, 90:10:0,3 y 80:20:0,3) para obtener el compuesto **22** (67 mg, 65%) como un aceite amarillento.

Datos espectroscópicos de **22** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 1.46 (s, 9H, CMe<sub>3</sub>), 1.62-1.64 y 1.63-1.65 (dos d, *J* = 6.3,

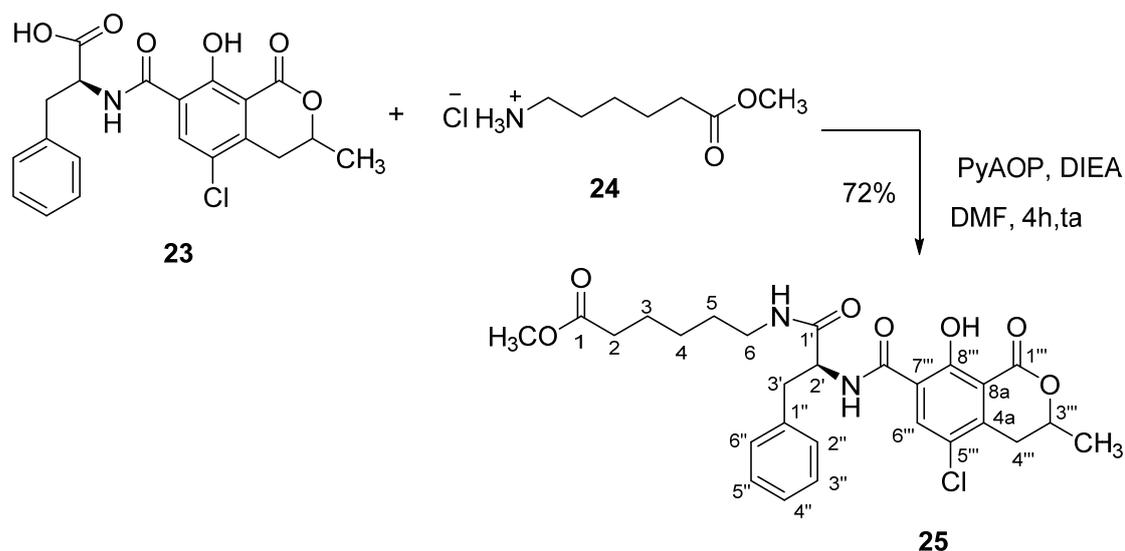
1.5H cada uno, Me-3' de cada diastereoisómero), 2.84-2.89 y 2.90-2.95 (dos dd,  $J = 11.7, 3.4$  Hz, 0.5H cada uno, H-4' de cada diastereoisómero), 3.25 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3), 3.33 (dd,  $J = 17.3, 3.4$  Hz, 1H, H'-4'), 4.80 (m, 1H, H-3'), 5.01 (dt,  $J = 7.4, 6.0$  Hz, 1H, H-2), 7.20-7.38 (m, 5H, Ph), 8.49 (s, 1H, H-6'), 8.58-8.62 (dos d,  $J = 6.9$  Hz, 0.5H cada uno, NH de cada diastereoisómero), 12.77 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) 20.6 (Me-3'), 27.9 (CMe<sub>3</sub>), 32.2 (C-4'), 38.1 (C-3), 54.5 (C-2), 75.8 (C-3'), 82.3 (CMe<sub>3</sub>), 110.0 (C-8a), 120.8 (C-7'), 123.0 (C-5'), 126.9 (C-4''), 128.3 (C-2'' y C-6''), 129.5 (C-3'' y C-5''), 136.2 (C-1''), 138.9 (C-6'), 140.5 (C-4a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.3 (C-1). EMAR (TOF ESI+): calculado para C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>ClNO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 460.1521, encontrado 460.1522.



*Preparación del ácido 2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-fenilpropanóico (23, OTA).* Ácido trifluoroacético (1,27 mL, 16,28 mmol, 370 equiv) se añadió sobre una disolución del éster **22** (20,5 mg, 0,045 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (2 mL) y la mezcla se mantuvo bajo agitación durante 2h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida para obtener **23** (17.6 mg, 99%) como un sólido de color crema.

Datos espectroscópicos de **23** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros): <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ (ppm) 1.60 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Me-3'), 2.82 y 2.88 (dos dd,  $J = 11.5, 3.2$  Hz, 0.5H cada uno, H-4' de cada diastereoisómero), 3.16-3.40 (m, 3H, H<sub>2</sub>-3 y H'-4'), 4.75 (m, 1H, H-3') 4.99-5.08 (m, 1 H, H-2) 7.10-7.37 (m, 5H, Ph) 8.42 (s, 1H, H-6'), 8.50 (dos d,  $J = 6.8$  Hz, 0.5H cada uno, NH de cada diastereoisómero), 12.74 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ (ppm) 20.6 (Me-3'), 32.2 (C-4'), 37.3 (C-3), 54.3

(C-2), 75.9 (C-3'), 110.0 (C-8a), 120.2 (C-7'), 123.2 (C-5'), 127.3 (C-4''), 128.3 (C-2'' y C-6''), 129.3 (C-3'' y C-5''), 135.7 (C-1''), 138.9 (C-6'), 141.0 (C-4a), 159.0 (C-8'), 163.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 175.1 (C-1). EMAR (TOF ESI+): calculado para  $C_{20}H_{19}ClNO_6$   $[M+H]^+$  404.0895, encontrado 404.0901.

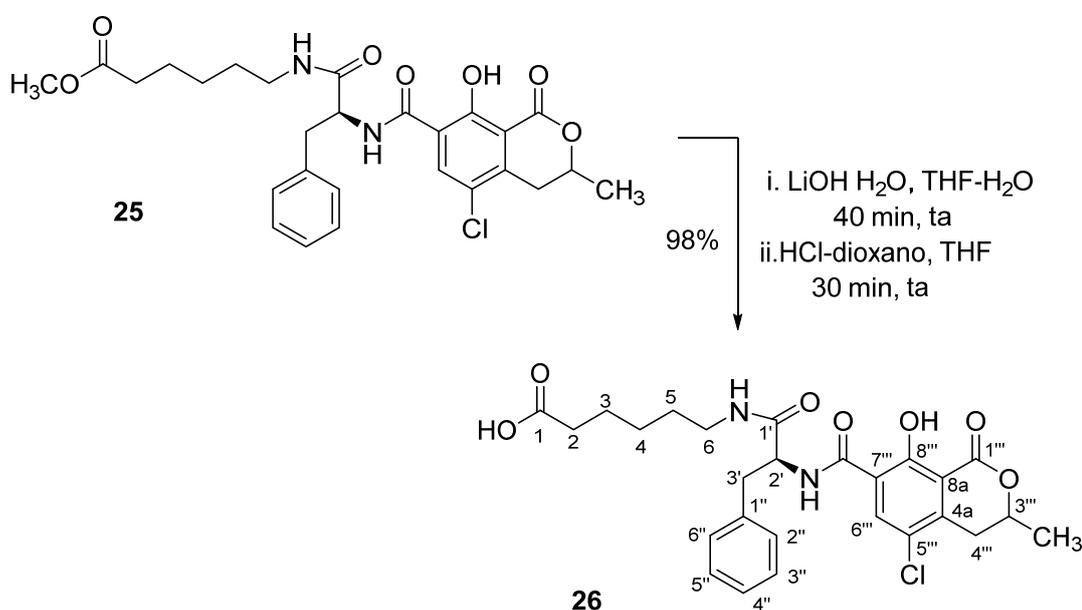


5

*Preparación de 6-(2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-fenilpropanamido)hexanoato de metilo (25).* Sobre una disolución del ácido **23** (18 mg, 0,044 mmol) y cloruro de 6-metoxi-6-oxohexan-1-amonio (**24**, 9,4 mg, 0,052 mmol, 1,1 equiv) en DMF anhidra (600  $\mu$ L) bajo nitrógeno se añadió DIEA (25  $\mu$ L, 0,143 mmol, 3,25 equiv), la mezcla resultante se agitó durante 10 minutos y seguidamente se añadió una disolución de PyAOP (34 mg, 0,065 mmol, 1,5 equiv) en DMF anhidra (600  $\mu$ L). Tras 4 horas de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con AcOEt y se lavó con disoluciones acuosas de LiCl (1,5%) y  $NaHCO_3$  (5%) y salmuera, se secó sobre  $MgSO_4$  anhidro. El residuo obtenido tras la evaporación del disolvente a presión reducida se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de  $CHCl_3$ -MeOH (100:0 y 99:1) para obtener la amida **25** (16,8 mg, 72%) como un aceite amarillento.

Datos espectroscópicos de **25** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros):  $^1H$ -RMN ( $CDCl_3$ , 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.11-1.28 (m, 2H,  $H_{2-4}$ ), 1.31-1.44 (m, 2H,  $H_{2-5}$ ), 1.49-1.63 (m, 2H,  $H_{2-3}$ ), 1.61 (dos d,  $J = 6.4$  Hz, 1.5H cada uno, Me-3''') de cada uno de los diastereoisómeros), 2.17-2.34 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $H_{2-2}$ ), 2.86 (dos dd,  $J = 11.6, 1.6$  Hz, 0.5H cada uno, H-4''') de cada diastereoisómero), 3.04-3.37 (m, 5H,  $H_{2-6}$ ,  $H_{2-3'}$  y H'-

4'''), 3.66 (s, 3H, OMe), 4.62-4.89 (m, 2H, H-3''' y NH), 5.83 (m, 1H, H-2'), 7.12-7.40 (m, 5H, Ph), 8.41 (s, 1H, H-6'''), 8.59 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, NH), 12.81 (s, 1H, OH).  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  (ppm) 20.7 (Me-3'''), 24.4 (C-3), 26.2 (C-4), 28.9 (C-5), 32.2 (C-4'''), 33.8 (C-2), 38.4 (C-3'), 39.2 (C-6), 51.5 (OMe), 55.7 (C-2'), 75.9 (C-3'''), 110.1 (C-8a), 120.6 (C-7'''), 123.1 (C-5'''), 127.0 (C-4''), 128.6 (C-2'' y C-6''), 129.3 (C-3'' y C-5''), 136.8 (C-1''), 138.8 (C-6'''), 140.8 (C-4a), 159.0 (C-8'''), 162.7 (CONH), 169.7 (C-1'''), 170.4 (C-1'), 173.9 (C-1). EMAR (TOF ESI+): calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{ClN}_2\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  531.1893, encontrado 531.1878.

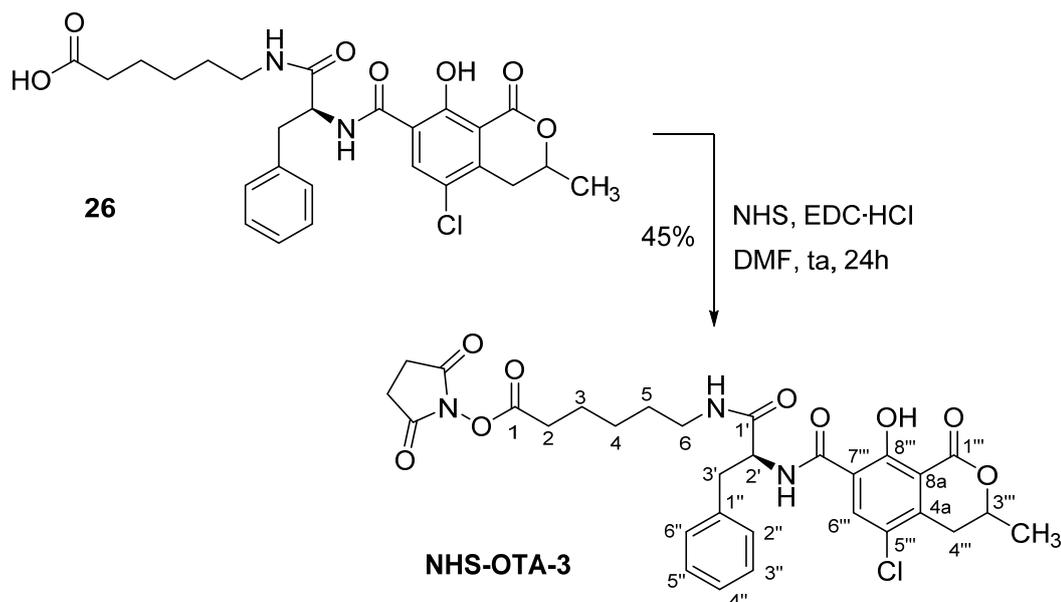


10 *Preparación del ácido 6-(2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido) 3-fenilpropanamido) hexanóico (26)*. Una disolución de  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (13 mg, 0,31 mmol, 10 equiv) en agua (700  $\mu\text{L}$ ) se añadió sobre una disolución del éster metílico **25** (16,6 mg, 0,031 mmol) en THF (700  $\mu\text{L}$ ) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de

15 hielo y se acidificó con una disolución acuosa 1M de  $\text{KHSO}_4$  hasta  $\text{pH}=2$ , se diluyó con  $\text{AcOEt}$ , se lavó con salmuera y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro para obtener, tras evaporar el disolvente a presión reducida, un residuo que se disolvió en THF anhidro (1,2 mL) sobre el que se añadió una gota de  $\text{HCl}$  4M en dioxano. Tras 30 min de

20 agitación a temperatura ambiente, el disolvente se eliminó a vacío hasta sequedad para obtener el ácido **26** (15,7 mg, 98%) como un semisólido amarillento.

Datos espectroscópicos de **26** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.18-1.28 (m, 2H, H<sub>2</sub>-4), 1.30-1.40 (m, 2H, H<sub>2</sub>-5), 1.42-1.52 (m, 2H, H<sub>2</sub>-3), 1.46-1.47 (dos d,  $J = 6.4$  Hz, 1.5H cada uno, Me-3'''), 2.14-2.20 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>-2), 2.88-3.08 (m, 6H, H-4''', H<sub>2</sub>-3', H<sub>2</sub>-6 y NH), 3.22 (dd,  $J = 17.2, 3.1$  Hz, 1H, H'-4'''), 4.69-4.76 (m, 1H, H-3'''), 4.84 (m, 1H, H-2'), 7.15-7.28 (m, 5H, Ph), 8.08 y 8.09 (dos s, 0.5H cada uno, H-6''' de cada diastereoisómero), 8.14 y 8.60 (dos m, 0.5H cada uno, NH de cada diastereoisómero).  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz):  $\delta$  (ppm) 20.0 (Me-3'''), 24.2 (C-3), 25.9 (C-4), 28.6 (C-5), 31.6 (C-4'''), 33.56 (C-2), 38.1 (C-3'), 38.4 (C-6), 54.5 (C-2'), 75.4 (C-3'''), 111.3 (C-8a), 120.2 (C-7'''), 121.4 (C-5'''), 126.4 (C-4'''), 128.1 (C-2'' y C-6'''), 129.2 (C-3'' y C-5'''), 136.0 (C-1''), 139.2 (C-6'''), 141.6 (C-4a), 158.4 (C-8'''), 162.54 (CONH), 169.9 (C-1'''), 169.9 (C-1'), 174.3 (C-1). EMAR (TOF ESI+): calculado para C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 517.1736, encontrado 517.1731.

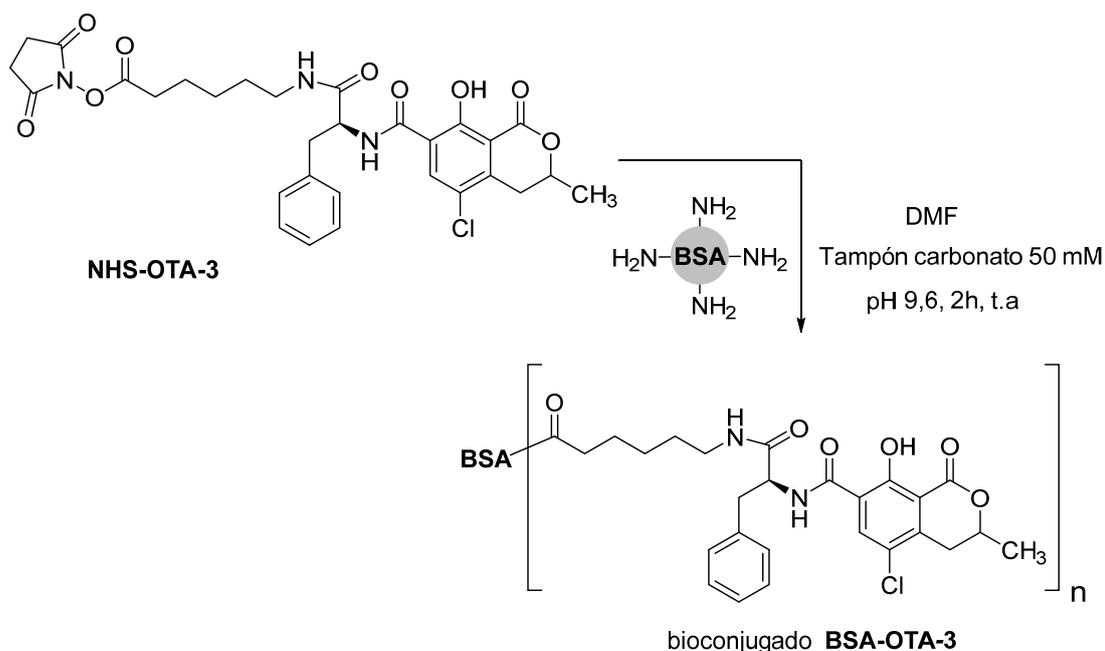


15 *Preparación de 6-(2-(5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxoisocromano-7-carboxamido)-3-fenil propanamido)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo* (Éster de *N*-hidroxisuccimidilo del hapteno OTA-3, **NHS-OTA-3**). Una disolución de EDC·HCl (7,0 mg, 0,037 mmol, 1,2 equiv) en DMF anhidra (0,5 mL) se adicionó sobre una disolución del ácido **26** (16 mg, 0,031 mmol) y NHS (3,9 mg, 0,034 mmol, 1,1 equiv) en DMF anhidra (0,5 mL) bajo nitrógeno. La mezcla se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas y a continuación se trató con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl, se diluyó con AcOEt y se lavó con disoluciones acuosas de LiCl (1,5%), NaHCO<sub>3</sub> (5%) y salmuera.

20

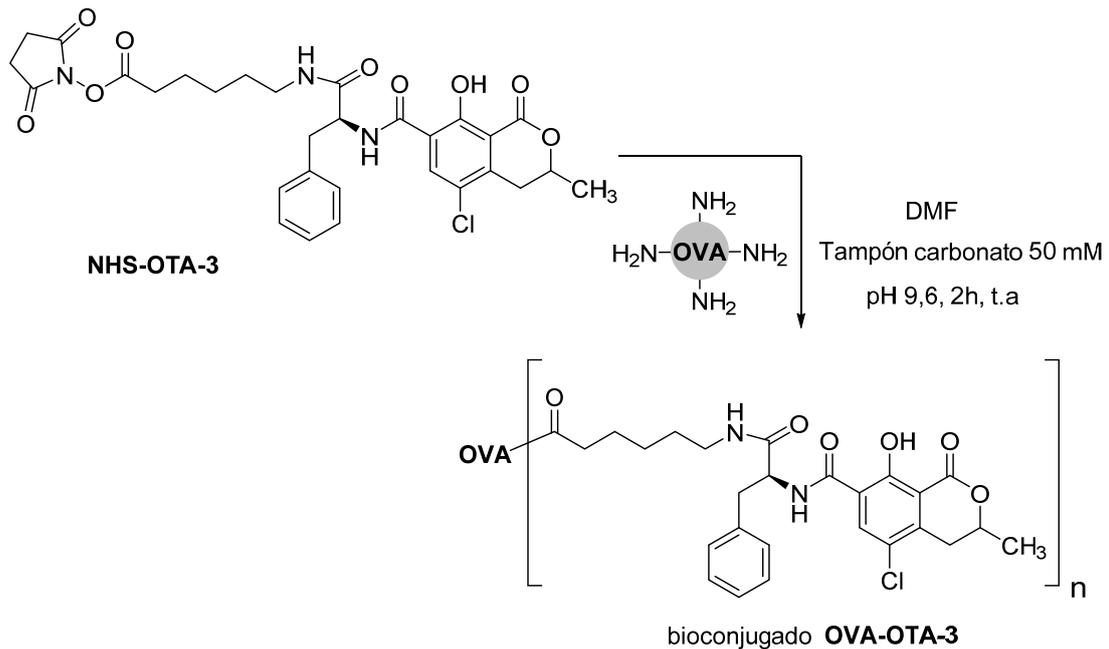
Tras secar sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y evaporar el disolvente a presión reducida se obtuvo un residuo que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetona (90:10, 85:15 y 80:20), para obtener el éster **NHS-OTA-3** (8,5 mg, 45%) como aceite amarillento.

- 5 Datos espectroscópicos de **NHS-OTA-3** (una mezcla 1:1 de diastereoisómeros):  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 1.29-1.37 (m, 2H,  $\text{H}_{2-4}$ ), 1.39-1.47 (m, 2H,  $\text{H}_{2-5}$ ), 1.60 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $\text{Me}-3''$ ), 1.64-1.78 (m, 2H,  $\text{H}_{2-3}$ ), 2.56 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{2-2}$ ), 2.76-2.93 (m, 5H,  $\text{H}-4''$ ,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.06-3.37 (m, 5H,  $\text{H}'-4''$ ,  $\text{H}_{2-3'}$  y  $\text{H}_{2-6}$ ), 4.68-4.91 (m, 2H,  $\text{H}-3''$  y NH), 6.04 (m, 1H,  $\text{H}-2'$ ), 7.16-7.35 (m, 5H, Ph), 8.38 (s, 1H,  $\text{H}-6''$ ),  
 10 8.60 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, NH), 12.79 (s, 1H, OH). EMAR (TOF ESI+): calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{ClO}_9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  614.1900, encontrado 614.1892.



### 3.2. Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-3 con BSA (**BSA-OTA-3**).

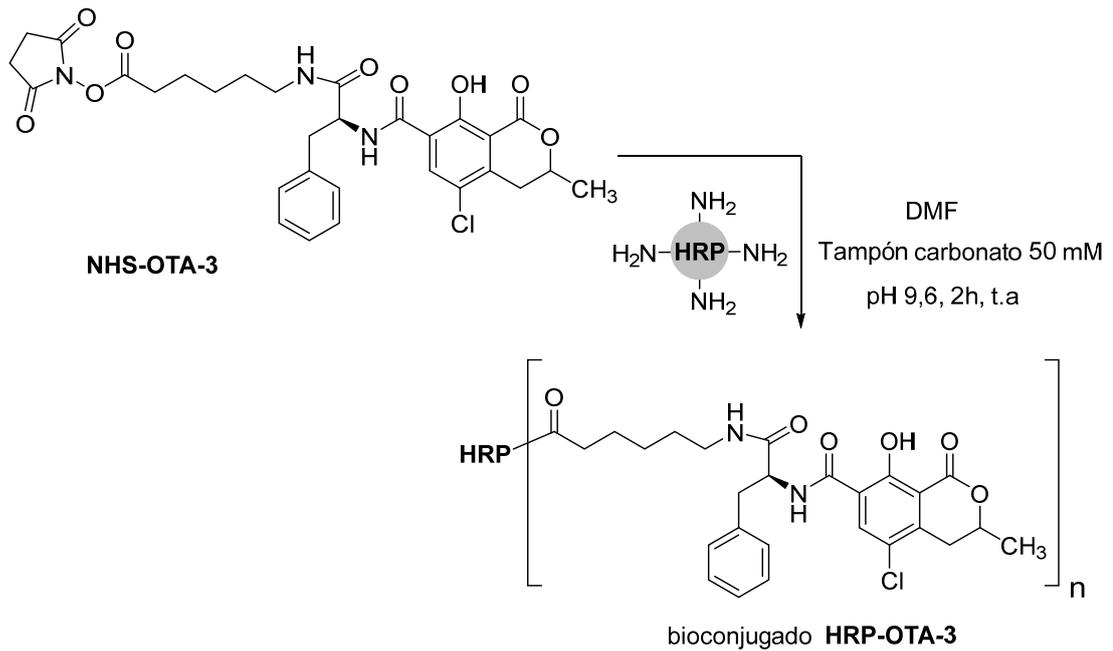
- Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado BSA-OTA-1 a  
 15 partir de 178  $\mu\text{L}$  de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-OTA-3  
 y 1,6 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6.  
 Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se  
 llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución y se almacenaron  
 a  $-20$   $^\circ\text{C}$ . El número de moléculas de OTA-3 conjugadas por cada molécula de BSA,  
 20 determinado por MALDI-TOF-MS, fue de  $n = 14,4$  (ver Tabla 3, entrada 1).



3.3. *Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-3 con OVA (OVA-OTA-3).* Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado OVA-OTA-1 a partir de 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado NHS-OTA-3 y 1,9 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6. Tras la correspondiente purificación cromatográfica, las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0,01% (v/v) y se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . El número de moléculas de OTA-3 conjugadas por cada molécula de OVA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de  $n =$

5

10 3,0 (ver Tabla 3, entrada 2).



3.4. Preparación de un bioconjugado del hapteno OTA-3 con HRP (**HRP-OTA-3**). Preparado a partir de 80  $\mu\text{L}$  de una disolución 5 mM del hapteno activado NHS-OTA-3 en DMF y 0,9 mL de una disolución de HRP (2,5 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 7,4. Tras la purificación cromatográfica, las fracciones obtenidas conteniendo el bioconjugado se llevaron a una concentración de 470  $\mu\text{g/mL}$  en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenaron a 4  $^{\circ}\text{C}$ . El número de moléculas de OTA-3 conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de  $n = 0,9$  (ver Tabla 3, entrada 3).

**TABLA 3.** Valores de la carga hapténica de los conjugados proteicos del hapteno OTA-3 determinados por MALDI-TOF-MS

	$RM_0$	$m/z$ proteína referencia	$m/z$	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/\text{hapteno}$	$n$	
1	BSA-OTA-3	24	66.428	73.642	7.214	500	14,4
2	OVA-OTA-3	8	21.340 <sup>#</sup>	22.079 <sup>#</sup>	739	500	3,0
3	HRP-OTA-3	8	43.928	44.382	454	500	0,9

$RM_0$ ,  $n$ ,  $\Delta(m/z)$ ,  $\Delta m/\text{hapteno}$  y  $\#$  tienen el mismo significado que en pie de Tabla 1.

## 2. Procedimiento ELISA

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada anticuerpo se evaluó en los dos formatos clásicos de ELISA competitivo (el de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta y el de anticuerpo inmovilizado con detección directa y pretapizado) usando antígenos de ensayo homólogos, es decir, un antígeno de ensayo a partir del mismo bioconjugado de fórmula (I) o bioconjugado comparativo que el utilizado para obtener el inmunógeno pero en el que **P** = OVA o HRP. Después de cada etapa de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con una disolución de lavado, usando un lavador de 96 canales ELx405 (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.). La señal producida por la peroxidasa utilizada como marcador se reveló con 100  $\mu$ L por pocillo de una disolución 2 mg/mL de *o*-fenilendiamina en tampón citrato 25 mM, fosfato 62 mM, pH 5,4, conteniendo 0,012% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100  $\mu$ L por pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. Al finalizar los ensayos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 492 nm usando una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de microplacas PowerWave HT (Biotek Instruments, Winooski, EE.UU.). Las curvas patrón sigmoideas obtenidas al representar la absorbancia frente a la concentración de analito se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando el paquete informático SigmaPlot de SPSS (Chicago, EE.UU.).

La afinidad del anticuerpo (IC<sub>50</sub>) se estimó como la concentración de analito libre capaz de reducir a la mitad la señal máxima (A<sub>max</sub>).

### 2.1. Ensayos ELISA competitivos en formato de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta (ensayo indirecto)

Las placas se tapizaron con 100  $\mu$ L por pocillo de una disolución de antígeno de ensayo que es un bioconjugado de fórmula (I) o bioconjugado comparativo donde **P** es OVA, a diversas concentraciones en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, mediante incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50  $\mu$ L por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50  $\mu$ L por pocillo de un determinado anticuerpo diluido en PBST (0,05% Tween 20). La reacción inmunoquímica se llevó a

cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. A continuación, cada pocillo recibió 100  $\mu$ L de una dilución 1/2000 de RAM–HRP (inmunoglobulinas de conejo anti-ratón marcadas con peroxidasa) en PBST. Esta reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar las placas, se  
5 reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito anteriormente.

## **2.2. Ensayos ELISA competitivos en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa (ensayo directo)**

10

Las placas se tapizaron con 100  $\mu$ L por pocillo de una dilución de anticuerpo de captura en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, se añadió 100  $\mu$ L por pocillo de anticuerpo o antisuero en PBST a la concentración o dilución considerada como  
15 óptima, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar de nuevo las placas, en cada columna se dispensó 50  $\mu$ L por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50  $\mu$ L por pocillo de una dilución concreta en PBST de bioconjugado enzimático que es un bioconjugado de fórmula (I) o bioconjugado comparativo donde **P** es HRP. La reacción inmunológica se llevó a  
20 cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. Finalmente, se reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito.

## **3. Inmunización de conejos**

25

Se inmunizaron, siguiendo protocolos estandarizados, 2 hembras de conejo de la raza New Zealand con cada bioconjugado de fórmula (I) o bioconjugado comparativo donde **P** es BSA. Cada animal recibió 0,3 mg de uno de los bioconjugados de fórmula (I) o el bioconjugado comparativo disuelto en 1 mL de una mezcla 1:1 de tampón PB y adyuvante de Freund completo. La inmunización prosiguió con la inoculación de una  
30 dosis de recuerdo cada 21 días con la misma cantidad de conjugado pero empleando adyuvante de Freund incompleto. Diez días después de la cuarta inyección, los animales fueron desangrados y la sangre obtenida se dejó coagular a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperaron los sueros por centrifugación, se diluyeron a ½ con PBS frío y se les añadió un volumen de una disolución saturada de

sulfato amónico. El precipitado proteico resultante de cada suero se recogió por centrifugación y se redisolvió en tampón PBS frío. Finalmente, las proteínas se reprecipitaron como anteriormente y se almacenaron en este estado a 4 °C. Este precipitado contiene una mezcla indeterminada de proteínas que denominamos  
5 antisuero, anticuerpo policlonal o simplemente anticuerpo. Se obtuvieron dos anticuerpos de cada bioconjugado de fórmula (I) y del bioconjugado comparativo donde **P** es BSA, identificados como #1 y #2.

#### **4. Producción de anticuerpos monoclonales de ratón**

10

##### **4.1. Inmunización de ratones**

Para la inmunización se emplearon los bioconjugados de fórmula (**Ia**) y (**Ib**) en los que **P** es BSA (conjugados inmunizantes) obtenidos en los ejemplos anteriores. Se  
15 utilizaron hembras de ratón BALB/c, con una edad al inicio del proceso comprendida entre 6 y 8 semanas.

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

##### **4.2. Fusiones celulares para la obtención de hibridomas**

Las fusiones con los ratones inmunizados se llevaron a cabo básicamente siguiendo  
30 metodologías previamente descritas y bien establecidas en el estado de la técnica. Inmediatamente después del sacrificio de los ratones se extrajo el bazo, que se homogeneizó con el émbolo de una jeringa estéril. Tras lisar los glóbulos rojos por choque osmótico con 1 mL de tampón de lisis durante un minuto en frío, los linfocitos

se lavaron 2 veces con medio completo (con suero) frío y se filtraron para eliminar los coágulos formados.

5 La línea de mieloma P3-X63-Ag8.653 fue cultivada los días previos a la fusión en medio DMEM suplementado [2 mM L-alanina-L-glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales, 25 µg/mL gentamicina, suero bovino fetal (SBF) 10% (v/v)], manteniendo las células en fase de crecimiento exponencial, de manera que el día de la fusión se dispuso de un número suficiente de las mismas.

10 Tras dos lavados con medio sin suero, ambas poblaciones celulares se juntaron a una relación linfocito:mieloma 4:1. A continuación, las células se centrifugaron, para inmediatamente después llevar a cabo la fusión celular. Para ello, se empleó el agente fusionante químico PEG1500 (1 mL por bazo, 1 min), que al disolver parcialmente las membranas permite la fusión de las células. Una vez fusionadas ambas poblaciones,  
15 las células se resuspendieron en medio DMEM suplementado [SBF 15% (v/v)] y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (100 µL por pocillo) a una densidad celular de  $150 \times 10^3$  linfocitos por pocillo, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad. 24 h después de la fusión, se añadió 100 µL por pocillo de medio HAT para selección de hibridomas [DMEM suplementado con 100 µM  
20 hipoxantina, 0,4 µM aminopterina, 16 µM timidina, y SBF 20% (v/v)] que contenía HFCS (*High Fusion and Cloning Supplement*) al 1% (v/v).

#### **4.3. Selección, clonaje y conservación de hibridomas**

25 Aproximadamente 10–12 días después de la fusión celular se llevó a cabo la evaluación de los sobrenadantes de los pocillos sembrados, con objeto de identificar cuáles contenían hibridomas secretores de anticuerpos capaces de reconocer ocratoxina A tanto en su forma conjugada como libre (clones competidores). Previamente, se determinó por inspección visual la eficiencia de la fusión, definida  
30 como el porcentaje de pocillos que presentaban al menos un clon claramente visible al microscopio.

Para llevar a cabo la identificación de clones competidores, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante la técnica ELISA diferencial, que consiste en analizar

paralelamente en pocillos adyacentes cada sobrenadante en ausencia de analito y en presencia de una concentración prefijada de analito, habitualmente 100 nM. Para ello, las placas se tapizaron con el conjugado homólogo, que es un bioconjugado de fórmula (I) en el que P es OVA, a una concentración de 0,1 µg/mL, y el ensayo se llevó a cabo añadiendo 50 µL del sobrenadante de cultivo. Las condiciones para el formato de ELISA indirecto se detallan en el apartado 2.1.

A continuación, se seleccionaron aquellos pocillos que contenían hibridomas productores de anticuerpos capaces de proporcionar una señal de absorbancia igual o superior a 0,5 en el ensayo en ausencia de ocratoxina A e inhibición de la señal igual o superior al 80% en el ensayo en presencia de ocratoxina A. Adicionalmente, para todos los pocillos positivos se llevó a cabo un segundo cribado más exhaustivo en modo bidimensional competitivo con el fin de seleccionar con mayor seguridad los mejores hibridomas. Para ello, el sobrenadante de cada hibridoma se ensayó a 4 diluciones (1/8, 1/32, 1/128 y 1/512) en placas tapizadas con el bioconjugado homólogo a 0,01 y 0,1 µg/mL, y utilizando como competidor ocratoxina A a 10 y 100 nM (en ensayo). Así, 200 µL del sobrenadante de cultivo se diluyeron en 600 µL de PBST y las siguientes diluciones se hicieron de forma seriada a partir de esta primera. El ensayo se realizó añadiendo 50 µL por pocillo de la correspondiente dilución de sobrenadante y 50 µL de la disolución de ocratoxina A en PBS a la concentración de 100, 10 y 0 nM.

Las células de los pocillos finalmente seleccionados se clonaron por el método de dilución límite, sembrando a partir de cada pocillo una nueva placa de 96 pocillos a 2 células por pocillo en medio HT, de igual composición que el HAT pero sin aminopterina, y conteniendo HFCS al 1% (v/v).

Generalmente, 7-10 días después del primer clonaje, se identificaron por inspección visual los pocillos que contenían un único clon, evaluándose de nuevo el sobrenadante de cultivo de la misma forma que se ha descrito previamente para los sobrenadantes de fusión. Este proceso se realizó tantas veces como fue necesario (al menos dos) para asegurar la monoclonalidad de los hibridomas seleccionados, así como su estabilidad. Finalmente, se procedió a la expansión de las líneas celulares seleccionadas, cultivando progresivamente el hibridoma en recipientes de mayor

volumen. Una vez crecido el clon, las células se congelaron en nitrógeno líquido a una concentración de  $10^7$  células por vial (2-4 viales para cada hibridoma) en una disolución de SBF con DMSO 10% (v/v) como agente crioprotector. Los viales se mantuvieron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el interior de una caja de poliestireno durante 24 h antes de  
5 pasarlos al contenedor de nitrógeno líquido.

#### 4.4. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales

En la última fase de la expansión celular de los hibridomas, éstos se dividieron  
10 progresivamente en placas de cultivo hasta alcanzarse un volumen final comprendido entre 100 y 200 mL de sobrenadante. Se dejaron crecer las células hasta alcanzar la confluencia, y una vez agotados los nutrientes del medio de cultivo se procedió a recoger el contenido de las placas. El volumen recogido se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se precipitó mediante la adición de un volumen de  
15 una disolución saturada de sulfato amónico, manteniéndose a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su purificación.

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad con columnas de proteína G siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este propósito,  
20 el anticuerpo precipitado se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm ( $4000\times g$ ) y se descartó el sobrenadante. El precipitado que contenía los anticuerpos se redisolvió con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,4 y se filtró con membranas de nitrocelulosa (diámetro de poro  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ) para eliminar partículas en suspensión. La elución del anticuerpo de la columna se realizó con tampón citrato sódico 100 mM, pH 2,5. Las  
25 fracciones que contenían el anticuerpo se identificaron mediante espectrofotometría UV y se recogieron. La disolución se neutralizó adicionando Tris-HCl 1 M, pH 9,5. Finalmente, se determinó por espectrofotometría UV la concentración del anticuerpo purificado [ $A_{280}$  (1 mg/mL IgG) = 1,4] y se preparó una disolución de trabajo a una concentración de  $500\text{ }\mu\text{g/mL}$  en PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,01% (p/v),  
30 que se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La disolución restante se precipitó con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)], lo cual garantiza su estabilidad a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante años.

## 5. Resultados

### 5.1. Respuesta inmune y determinación de la afinidad de los antisueros

Cada uno de los antisueros obtenidos se ensayó frente a su antígeno de ensayo  
5 homólogo usando el ensayo de tipo ELISA competitivo en el formato de anticuerpo  
inmovilizado. Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno de ensayo frente a  
diferentes concentraciones de anticuerpo utilizando como competidor varias  
concentraciones de ocratoxina A preparadas por dilución seriada. Los tres  
inmunógenos produjeron respuestas inmunes adecuadas, con títulos elevados y  
10 habituales para este tipo de analitos. Sin embargo, mientras los antisueros  
procedentes de animales inmunizados con los inmunógenos de fórmula **la** y **lb**  
presentaron una elevada afinidad hacia ocratoxina A, con valores de  $IC_{50}$  cercanos o  
inferiores a 1 nM, los antisueros obtenidos a partir del inmunógeno comparativo  
mostraron afinidades hacia ocratoxina A claramente inferiores (mayor  $IC_{50}$ ). Este  
15 resultado confirma que unas estructuras son más idóneas que otras para el objetivo  
que se persigue, y que los haptenos funcionalizados a través de posiciones  
alternativas al grupo carboxilato de la ocratoxina A, y que por tanto dejan dicho grupo  
libre, dan lugar a anticuerpos de mayor afinidad hacia la micotoxina diana. Los valores  
de la señal máxima, de la  $IC_{50}$  y de la pendiente de la curva de inhibición resultante  
20 para cada antisuero con antígeno de ensayo homólogo se han incluido en la Tabla 4.

**TABLA 4** Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo de antisuero inmovilizado con detección directa

Antisuero &	Trazador	Dilución		Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
	(ng/mL)	As. (x10 <sup>3</sup> )	A <sub>max</sub>		
<b>la#1</b>	10	36	1,632	0,541	0,735
<b>la#2</b>	30	36	1,472	0,442	1,889
<b>lb#1</b>	30	12	1,523	0,408	0,445
<b>lb#2</b>	10	36	1,050	0,709	0,361
<b>Comp.#1</b>	10	12	1,574	0,394	9,842
<b>Comp.#2</b>	100	36	1,225	0,359	>100

& Antisueros de conejo; inmunización con los conjugados BSA-OTA-1 (**la**), BSA-OTA-2 (**lb**) y BSA-OTA-3 (**Comp.**),

## 5.2. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales frente a ocratoxina-A

5 Para demostrar de manera más concluyente la idoneidad de los bioconjugados de fórmula (**la**) y (**lb**) para la obtención de anticuerpos anti-ocratoxina A, se inmunizaron ratones con ambos conjugados de fórmula (**la**) y (**lb**) en los que **P** es BSA y se llevaron a cabo fusiones celulares encaminadas a la generación de hibridomas. Se consiguió obtener 4 líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales con elevada

10 afinidad hacia ocratoxina A a partir del bioconjugado de fórmula (**la**), y 7 líneas celulares a partir del bioconjugado de fórmula (**lb**). Los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de dichos hibridomas se han denominado a efectos de la presente invención y de los ejemplos aquí incluidos: mAb **la#39**, mAb **la#41**, mAb **la#310a** y mAb **la#310b** (anticuerpos monoclonales a partir del bioconjugado de fórmula **la**); y

15 mAb **lb#16**, mAb **lb#21**, mAb **lb#27**, mAb **lb#111**, mAb **lb#114**, mAb **lb#115** y mAb **lb#118** (anticuerpos monoclonales a partir del bioconjugado de fórmula **lb**). Estos resultados ponen de manifiesto que los bioconjugados de fórmula (**la**) y (**lb**) son adecuados para obtener anticuerpos monoclonales de muy elevada afinidad frente a ocratoxina A.

20

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

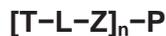
Una vez purificados por cromatografía de inmutofinidad los 11 anticuerpos monoclonales obtenidos, se determinó su afinidad hacia ocratoxina A mediante ELISA competitivo directo homólogo. Cada anticuerpo monoclonal se ensayó a varias concentraciones (100, 300 y 1000 ng/mL) frente a diferentes concentraciones de trazador enzimático (300, 100, 30 y 10 ng/mL), que es un derivado marcado de fórmula II donde Q es peroxidasa. Los valores de  $A_{max}$ , pendiente e  $IC_{50}$  para cada anticuerpo monoclonal que se muestran en la Tabla 5 corresponden a la combinación óptima, es decir, a la concentración de inmunorreactivos que generó la curva de calibración con un menor valor de  $IC_{50}$ , y por tanto una afinidad mayor para ocratoxina A. En dicho formato de ensayo los anticuerpos mostraron valores de  $IC_{50}$  para ocratoxina A comprendidos entre 0,071 y 1,457 nM, siendo el anticuerpo con mayor afinidad de entre los producidos a partir del bioconjugado de fórmula Ia el mAb Ia#310b ( $IC_{50}$ =0,071 nM), y el anticuerpo con mayor afinidad de entre los producidos a partir del bioconjugado de fórmula Ib el mAb Ib#115 ( $IC_{50}$ =0,169 nM).

**TABLA 5** Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo homólogo de anticuerpo inmovilizado con detección directa

Anticuerpo monoclonal	Trazador (ng/mL)	mAb (ng/mL)	$A_{max}$	Pendiente	$IC_{50}$ (nM)
Ia#38	10	100	1,880	1,309	0,504
Ia#39	30	100	1,907	0,891	1,457
Ia#310a	30	100	1,013	1,116	0,088
Ia#310b	30	100	1,054	1,324	0,071
Ib#16	30	100	1,739	2,003	0,397
Ib#25	30	100	1,639	1,468	0,394
Ib#27	30	100	1,830	1,128	1,114
Ib#111	30	100	1,679	2,219	0,321
Ib#114	30	100	1,958	1,442	0,623
Ib#115	100	100	1,245	1,277	0,169
Ib#118	100	100	2,499	1,646	0,357

## REIVINDICACIONES

1. Un bioconjugado de fórmula (I):

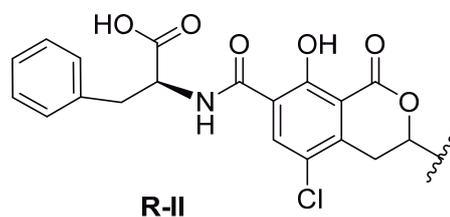
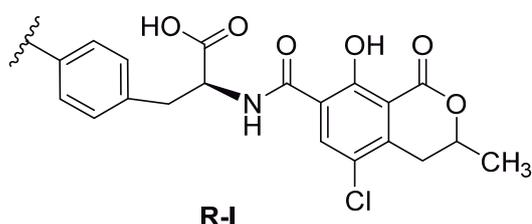


(I)

5

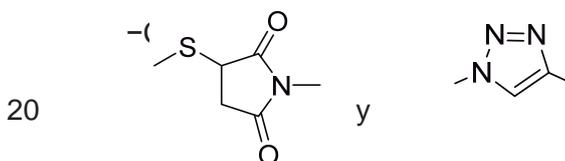
donde

T se selecciona del grupo que consiste en R-I y R-II;



10 L es una cadena hidrocarbonada de 0 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

15 Z es un grupo funcional seleccionado entre  $-(C=O)NH-$ ,  $-NH(C=O)-$ ,  $-(C=O)S-$ ,  $-S(C=O)-$ ,  $-(C=O)O-$ ,  $-O(C=O)-$ ,  $-O(C=O)O-$ ,  $-O(S=O)O-$ ,  $-O(SO_2)O-$ ,  $-NH(S=O)O-$ ,  $-O(S=O)NH-$ ,  $-NH(SO_2)O-$ ,  $-O(SO_2)NH-$ ,  $-(SO_2)NH-$ ,  $-NH(SO_2)-$ ,  $-O(C=O)NH-$ ,  $-NH(C=O)O-$ ,  $-NH(C=O)NH-$ ,  $-NH(C=S)NH-$ ,  $-NH-$ ,  $-N(\text{alquilo } C_1-C_6)-$ ,  $-S-$ ,  $-S-S-$ ,  $-NH-NH-$ ,  $-N=C-$ ,  $-C=N-$ ,  $-NH(C=NH)-$ ,  $-N=N-$ ,  $-O-$ ,



25 P es un péptido o polipéptido, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 daltons donde el péptido o polipéptido P puede estar o no unido, mediante interacción covalente, electrostática o de otro tipo, a un soporte y donde dicho soporte puede ser un polímero sintético o no, o estar compuesto por nanomateriales como nanotubos de carbono, zeolitas o sílice mesoporosa;

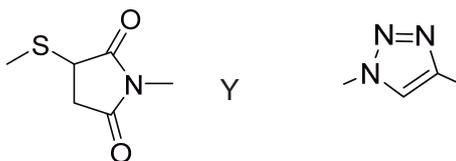
n es un número con un valor entre 1 y 500.

2. El bioconjugado de fórmula (I) según la reivindicación 1 caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

5

3. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en  $-(C=O)NH-$ ,  $-NH(C=O)-$ ,  $-O(C=O)NH-$ ,  $-NH(C=O)O-$ ,  $-NH(C=O)NH-$ ,  $-NH-$ ,  $-S-$ ,

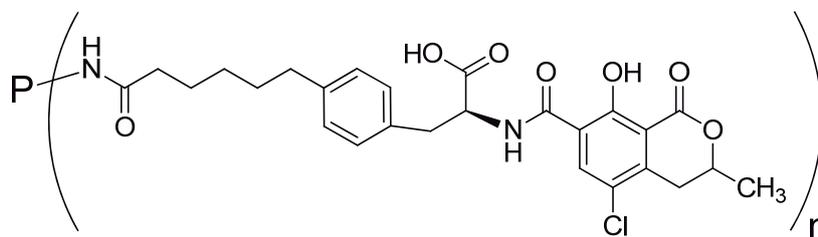
10



4. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, beta-galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

15

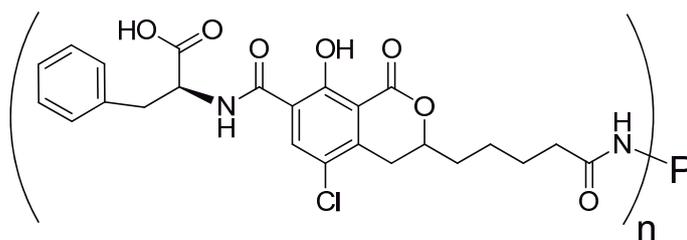
5. El bioconjugado de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con la fórmula (Ia)



(Ia)

20 donde **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

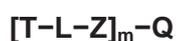
6. El bioconjugado de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, con la fórmula (Ib)



(Ib)

donde **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y **n** es un  
5 valor seleccionado entre 1 y 50.

7. Un derivado marcado de fórmula (II):



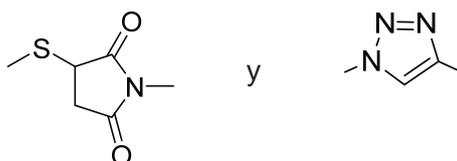
(II)

donde

**T**, **L** y **Z** son según se han definido en la reivindicación 1; **Q** es un marcador no  
isotópico detectable y **m** es un número con un valor entre 1 y 1000.

8. El derivado marcado de fórmula (II) según la reivindicación 7, donde **Q** se  
selecciona del grupo que consiste en enzimas, biotina, fluoresceína o uno  
cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina,  
un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus  
derivados, un éster de acridinio, nanoparticulas cuánticas (en inglés *quantum*  
20 *dots*), y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

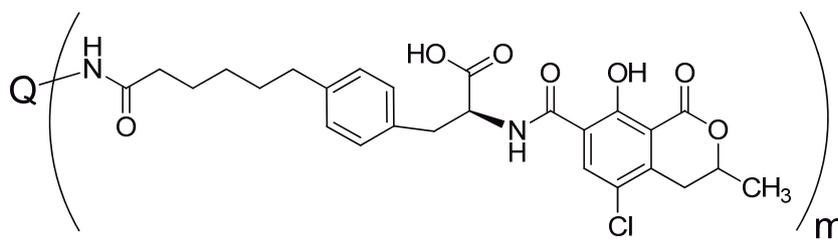
9. El derivado marcado de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 7  
u 8 caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en  $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-$   
25  $\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$ ,  $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,



10. El derivado marcado de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 7  
a 9 caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos

de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

11. El derivado marcado de fórmula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, con la fórmula (IIa)

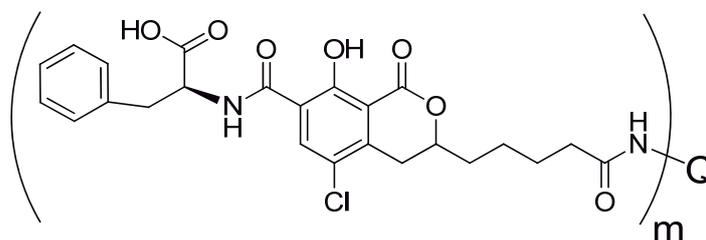


(IIa)

donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

10

12. El derivado marcado de fórmula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, con la fórmula (IIb)



(IIb)

donde **Q** se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa, biotina, fluoresceína o nanopartículas, y **m** es un valor seleccionado entre 1 y 10.

15

13. Un anticuerpo que reconoce específicamente un bioconjugado según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

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

25

15. Uso de un bioconjugado según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la obtención de un anticuerpo.

16. Método de análisis *in vitro* de ocratoxina A en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14.
- 5 17. Método según la reivindicación 16 que comprende las siguientes etapas:
- a) poner en contacto la muestra con el anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14;
  - b) incubar la muestra y el anticuerpo de la etapa (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica; y
  - 10 c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b).
18. Método según la reivindicación 17, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando
- 15 como competidor un bioconjugado según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
19. Método según la reivindicación 17, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando
- 20 como competidor un derivado marcado según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.
20. Kit de detección y/o determinación de ocratoxina A, que comprende al menos un anticuerpo según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 junto
- 25 con un bioconjugado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o junto con un derivado marcado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.
21. Método de purificación y/o concentración de ocratoxina A de una muestra que comprende el uso de un anticuerpo según se describe en una cualquiera de las
- 30 reivindicaciones 13 o 14.
22. Método según la reivindicación 21 realizado mediante cromatografía de afinidad que comprende las siguientes etapas:
- a) inmovilizar al menos un anticuerpo descrito en cualquiera de las reivindicaciones
  - 35 13 o 14 sobre un soporte;
  - b) hacer pasar la muestra a través de dicho soporte para que retenga la ocratoxina A presente en dicha muestra; y

c) eluir la ocratoxina A retenida en el soporte.

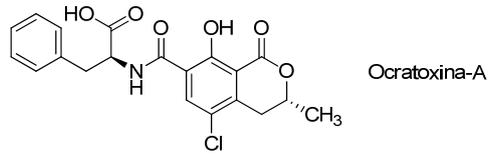


FIG. 1

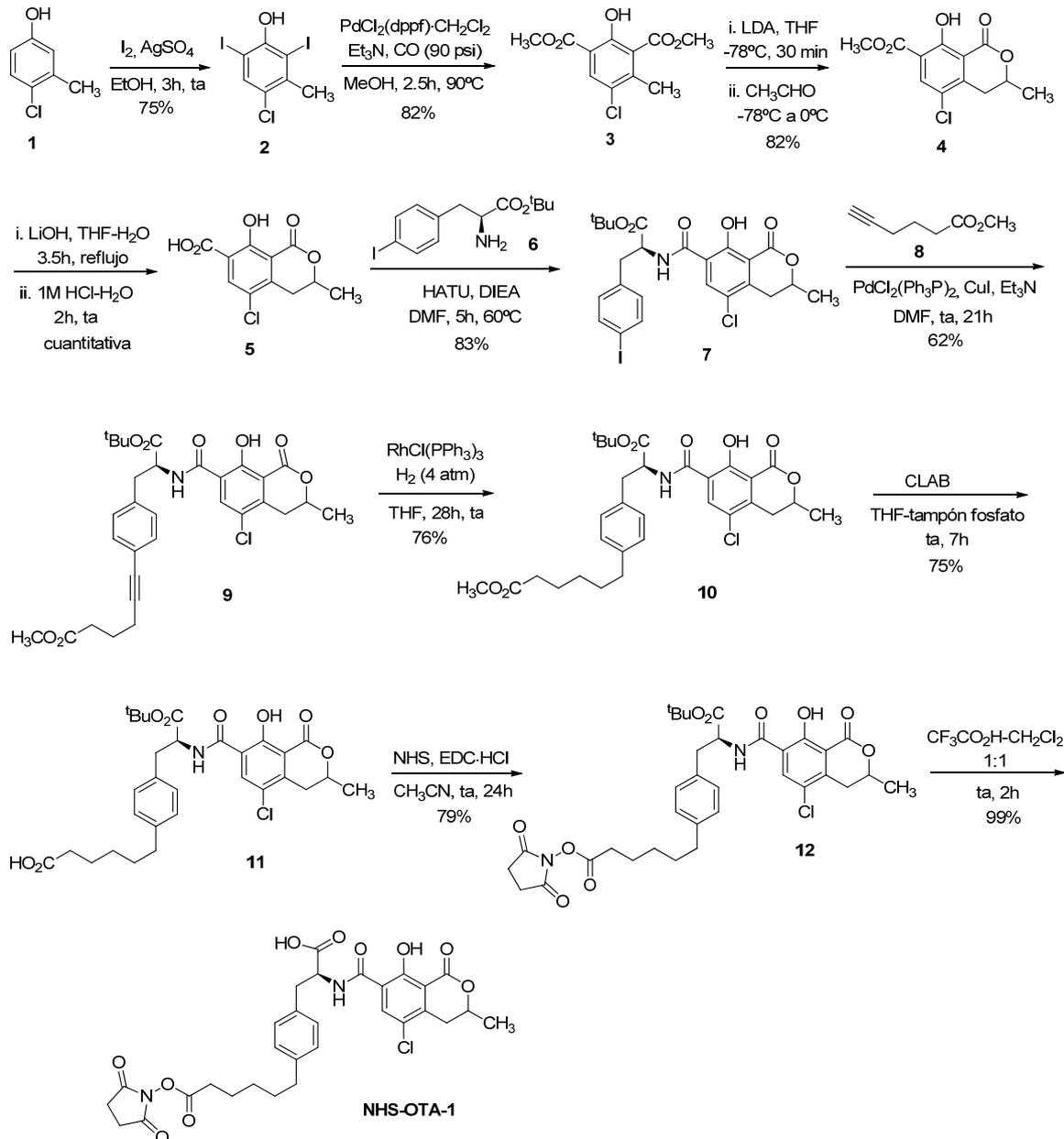


FIG. 2

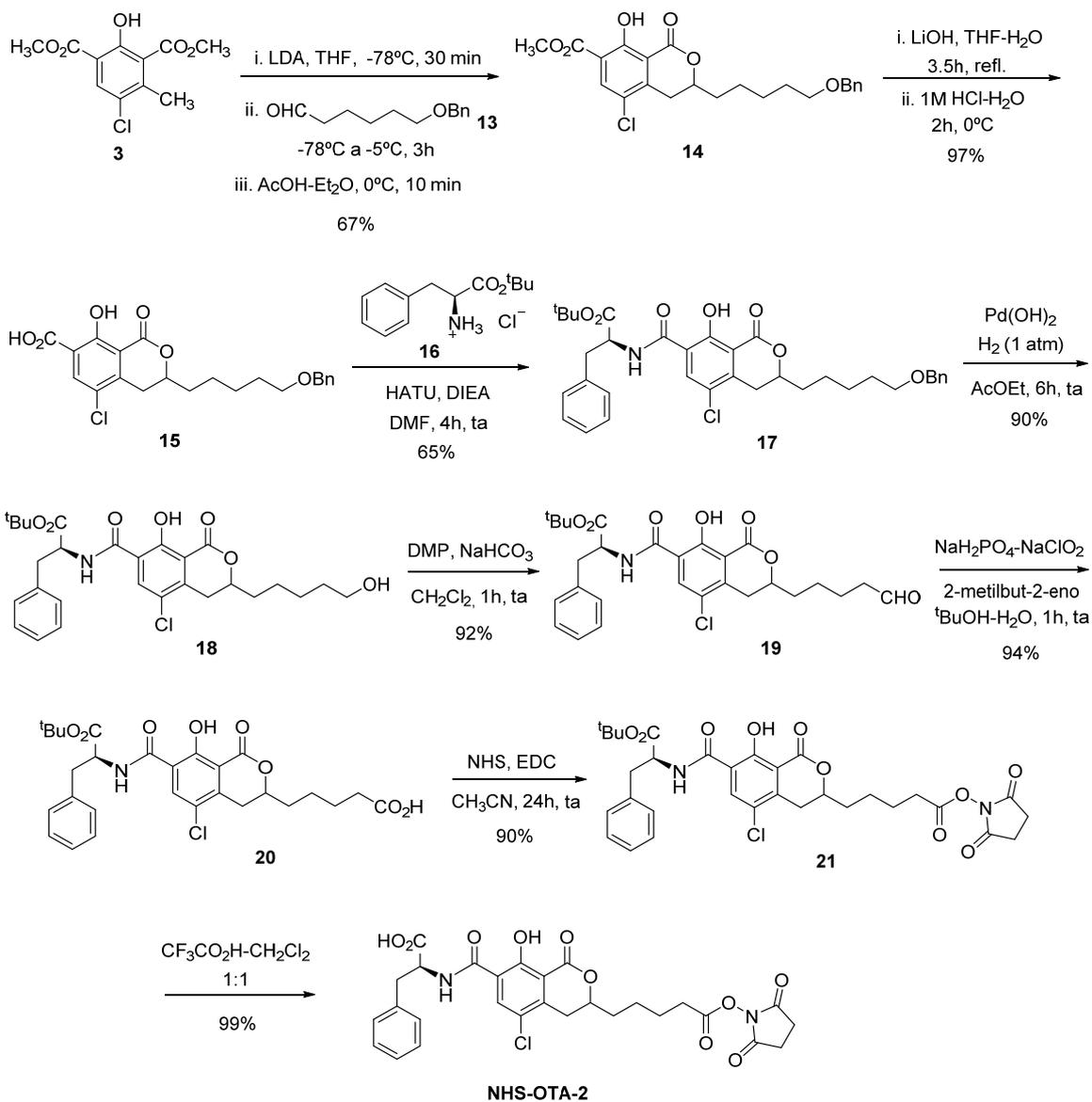


FIG. 3

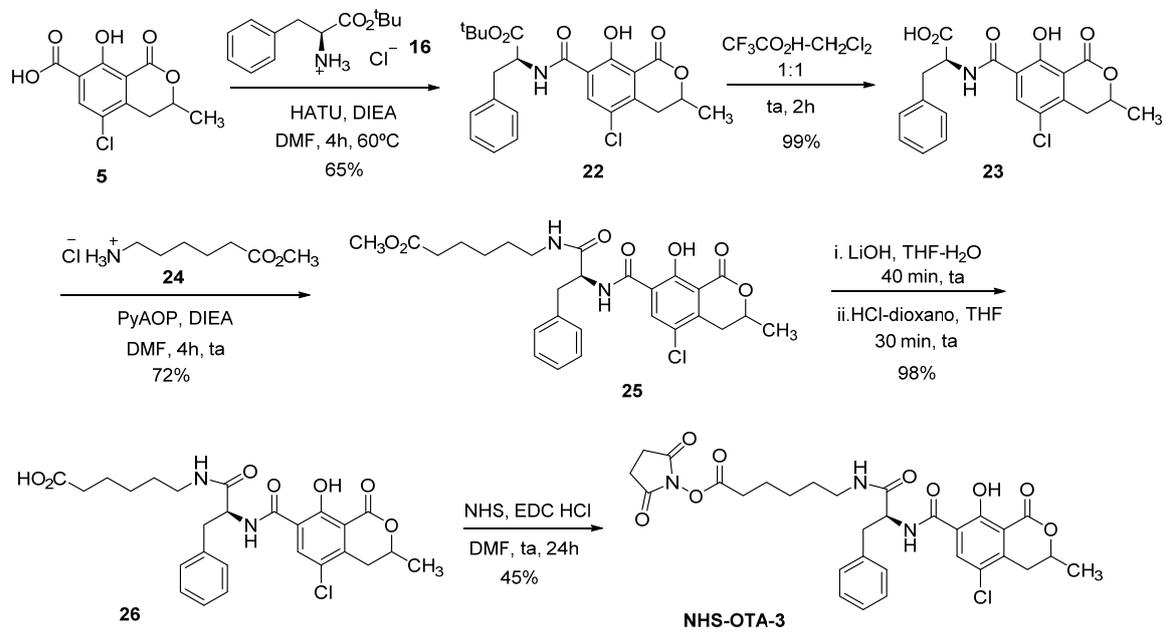


FIG. 4

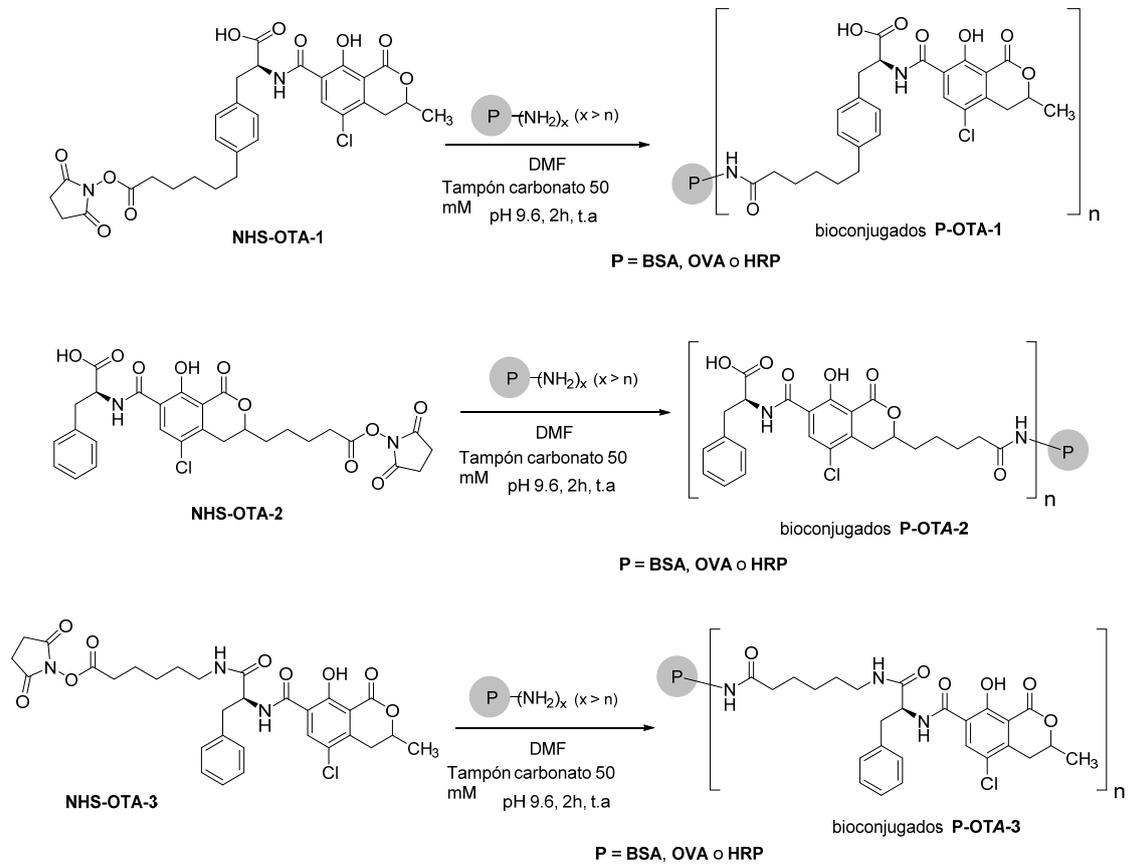


FIG. 5

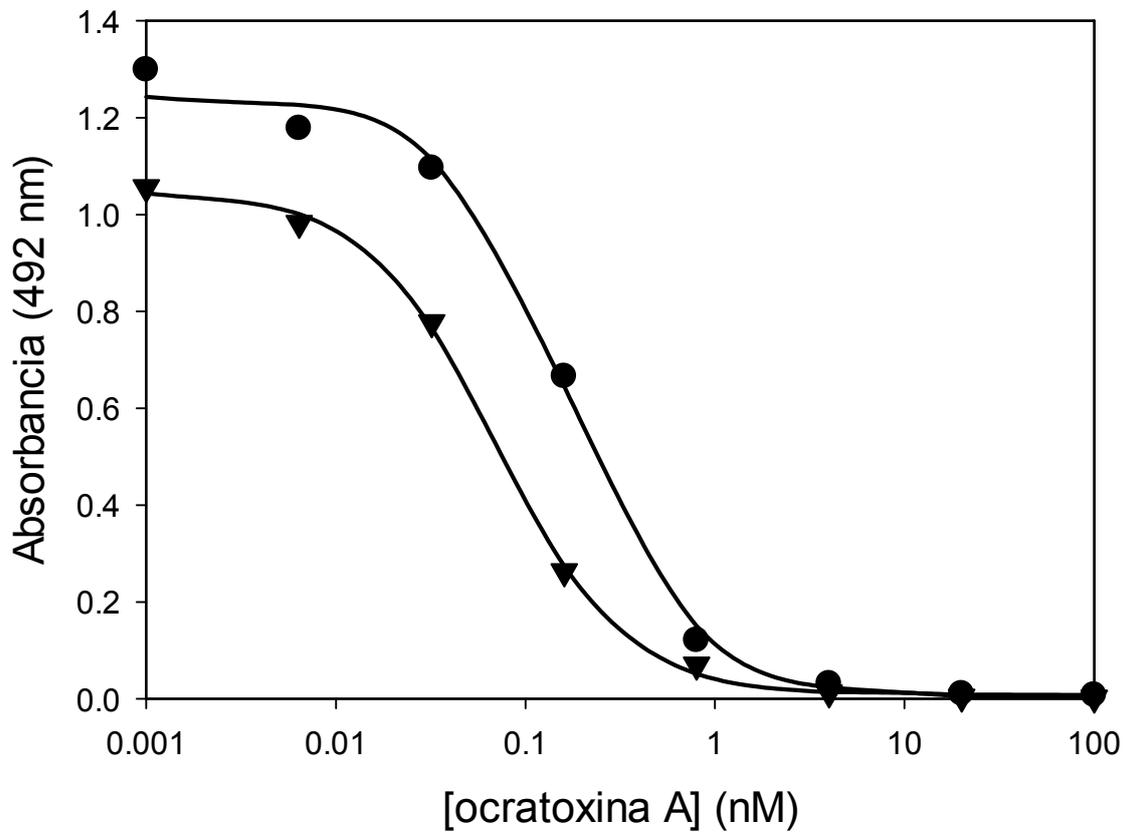


FIG. 6