

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 125**

21 Número de solicitud: 202030897

51 Int. Cl.:

C07D 493/14 (2006.01)

G01N 33/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

03.09.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.03.2022

Fecha de concesión:

13.10.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.10.2022

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ABAD FUENTES, Antonio;
MERCADER BADIA, Josep Vicent;
ABAD SOMOVILLA, Antonio y
AGULLÓ BLANES, Consuelo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **BIOCONJUGADOS HETERÓLOGOS Y SU USO PARA LA INMUNODETECCIÓN DE AFLATOXINAS**

57 Resumen:

Bioconjugados heterólogos y su uso para la inmunodetección de aflatoxinas.

La presente invención se refiere a bioconjugados de análogos fragmentarios de aflatoxinas que tienen propiedades novedosas hacia los anticuerpos producidos frente a bioconjugados de aflatoxina M1. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de estos bioconjugados y derivados marcados de estos análogos fragmentarios como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere a métodos de análisis utilizando estos bioconjugados o derivados marcados junto a anticuerpos producidos frente a aflatoxina M1. Esta invención también proporciona un kit para analizar aflatoxina M1 que comprende conjugados o derivados marcados de estos derivados fragmentarios junto con anticuerpos producidos frente a aflatoxina M1.

ES 2 898 125 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Bioconjugados heterólogos y su uso para la inmunodetección de aflatoxinas

5 La presente invención se refiere a bioconjugados de análogos fragmentarios de aflatoxinas que tienen propiedades novedosas hacia los anticuerpos producidos frente a bioconjugados de aflatoxina M1. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de estos bioconjugados y derivados marcados de estos análogos fragmentarios como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere a métodos de análisis utilizando
10 estos bioconjugados o derivados marcados junto a anticuerpos producidos frente a aflatoxina M1. Esta invención también proporciona un kit para analizar aflatoxina M1 que comprende conjugados o derivados marcados de estos derivados fragmentarios junto con anticuerpos producidos frente a aflatoxina M1.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

La presencia de contaminantes químicos tóxicos en los alimentos, particularmente en aquellos destinados al consumo infantil, es un tema de gran preocupación para los consumidores y las autoridades sanitarias europeas. Según los informes anuales publicados por el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) de la Comisión Europea, alrededor del 45%
20 de las notificaciones informativas emitidas en los últimos años estaban relacionadas con la presencia de sustancias químicas como plaguicidas, biotoxinas, medicamentos veterinarios, aditivos alimentarios, etc. Entre ellos, las micotoxinas son, cada año, el peligro responsable del mayor número de notificaciones. La presencia de micotoxinas en alimentos, piensos y bebidas ha sido reconocida como una amenaza potencial para la salud humana y animal, ya
25 sea causada por la contaminación directa de materiales vegetales o sus productos, o por la transferencia de dichas micotoxinas y sus metabolitos a los tejidos animales, leche y huevos como consecuencia de la ingesta de alimentos contaminados. Debido a la extrema dificultad para evitar su presencia, las micotoxinas también suponen una carga económica al sector agroalimentario que anualmente representa la pérdida de millones de euros en todo el mundo.

30 La contaminación por micotoxinas se considera un problema impredecible, incluso cuando se implementan buenas prácticas agrícolas, de almacenamiento y procesamiento, lo que supone un difícil desafío para garantizar la seguridad de los alimentos y piensos. Además, muchas micotoxinas no se eliminan fácilmente durante el procesamiento de los alimentos debido a su estabilidad frente a tratamientos físicos y químicos. Los principales hongos productores de

micotoxinas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Hasta el momento se han identificado más de 400 micotoxinas con gran diversidad estructural. Las más relevantes, debido a su incidencia y/o toxicidad, son las aflatoxinas, las ocratoxinas, la patulina, las fumonisinas, el deoxinivalenol, la zearalenona, el T-2 y el alternariol. En consecuencia, las autoridades nacionales e internacionales en salud pública han adoptado pautas regulatorias estrictas encaminadas a controlar la presencia de las principales clases de micotoxinas en alimentos y en piensos.

Las aflatoxinas se sitúan entre las más prevalentes y tóxicas de todas las micotoxinas potencialmente presentes en alimentos y piensos. Estas micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por especies del género *Aspergillus* (Figura 1), y son capaces de provocar diversos problemas de salud en el ser humano, como cáncer de hígado, supresión de la respuesta inmune, y daños intestinales y sobre el ADN. La exposición de los consumidores a aflatoxinas se produce a través de la ingesta de materias primas contaminadas y de sus derivados, así como también a través de la carne o leche de los animales que han consumido piensos contaminados. Entre los diferentes tipos de aflatoxinas, la aflatoxina B1 (AFB1) se considera la de mayor potencial carcinogénico. Cuando el ganado vacuno y otros rumiantes resultan expuestos a AFB1, la micotoxina se metaboliza a nivel hepático dando lugar a una serie de metabolitos, entre los que destaca la aflatoxina M1 (AFM1), la cual es excretada en la leche tras 12-24 horas [Matabaro et al., *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2017**, 16, 808–820]. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer ha incluido a AFM1 entre los carcinógenos de tipo 2B. En consecuencia, la presencia de AFM1 en leche y sus productos derivados supone un elevado riesgo para la salud humana, lo que ha llevado a las autoridades europeas a establecer un muy exigente nivel máximo de esta micotoxina en productos lácteos (0.05 ng/mL). La AFM1 se encuentra normalmente unida a la caseína, y es capaz de resistir los tratamientos térmicos a los que habitualmente se somete a la leche, lo que explica que se haya encontrado en alimentos destinados al consumo.

Los métodos inmunoanalíticos son técnicas rápidas, sencillas y económicas que gozan de un elevado grado de implantación como procedimientos de cribado en la determinación de micotoxinas, y en especial para la determinación de aflatoxinas en alimentos. Estas técnicas se basan en la elevada afinidad y especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. Desde un punto de vista inmunológico, AFM1 es un hapteno, es decir, una sustancia incapaz por sí misma de generar una respuesta inmune y por lo tanto de inducir la producción de anticuerpos cuando se inyecta en un animal. Con el propósito de obtener anticuerpos frente a compuestos de este tipo, la estrategia habitual consiste en introducir por síntesis química, en posiciones

5 adecuadas de la molécula diana, un brazo espaciador que contenga un grupo químico activable (p.e. un carboxilato) en su extremo. La activación de este grupo químico permite su acoplamiento a una proteína portadora, a enzimas, a marcadores químicos y a soportes de distinto tipo. Los conjugados resultantes del acoplamiento covalente entre el derivado
10 funcionalizado de la micotoxina y una proteína portadora se emplean tanto para la obtención de anticuerpos como para el desarrollo de inmunoensayos. Si bien la similitud estructural entre el derivado funcionalizado de la micotoxina (hapteno) y la propia micotoxina debe ser muy elevada para la generación de anticuerpos de elevada afinidad, la estructura de dicho hapteno admite cierto grado de tolerancia si su función es ser empleado como antígeno de ensayo para el desarrollo de métodos inmunoanalíticos.

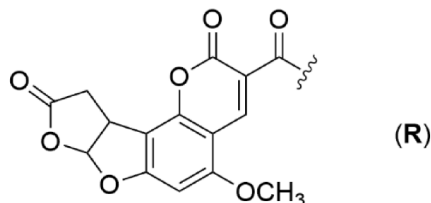
Es bien conocido en la bibliografía que la sensibilidad de un inmunoensayo competitivo puede incrementarse cuando el hapteno que forma parte del antígeno de ensayo es diferente del hapteno empleado para la producción de anticuerpos [Ceballos-Alcantarilla et al., *Analyst*, **2018**, 143, 5718–5727]. Este incremento de la sensibilidad se consigue a través de la
15 modificación del balance de los equilibrios analito–anticuerpo y conjugado–anticuerpo, generalmente mediante la modificación de la estructura del hapteno que forma parte del conjugado competidor (antígeno de ensayo), de tal forma que disminuya la afinidad del anticuerpo por el mismo. Esta estrategia se conoce como heterología y se basa en la utilización de conjugados competidores constituidos por los denominados haptenos heterólogos [Cao et al., *Talanta*, **2013**, 116, 173–180. Vasylyeva et al., *Environ. Sci. Technol.*, **2015**, 49, 10038–10047]. Las modificaciones que deben de realizarse en la estructura del hapteno inmunizante, epítipo del antígeno frente al cual se generan los anticuerpos, para conseguir el desplazamiento de los equilibrios analito–anticuerpo y conjugado–anticuerpo en la dirección adecuada no son obvias, ya que para que esta estrategia realmente mejore la
25 sensibilidad del inmunoensayo se requiere que el hapteno heterólogo sea reconocido por el anticuerpo, si bien con menor afinidad que el hapteno inmunizante (hapteno homólogo). En muchas ocasiones, incluso pequeñas modificaciones de la estructura del hapteno inmunizante conducen a la ausencia de reconocimiento y en consecuencia a la imposibilidad de llevar a cabo el inmunoensayo, una circunstancia que se da particularmente cuando los anticuerpos son monoclonales, en los cuales el paratopo, lugar de unión del anticuerpo, es muy específico para el epítipo del antígeno frente al cual se ha generado. En el caso de AFM1, los haptenos empleados hasta la fecha para la preparación de antígenos de ensayo han estado basados en acoplar la estructura completa de la micotoxina. Como se ha comentado, esta estrategia limita la sensibilidad de los inmunoensayos desarrollados, toda vez que el hapteno empleado
30 para la generación de los anticuerpos y para la preparación de los antígenos de ensayo es el

mismo (haptenos y conjugados homólogos). En consecuencia, los inmunoensayos desarrollados hasta la fecha presentan limitaciones para determinar de forma sencilla y fiable los exigentes límites máximos establecidos por la legislación europea para la presencia de AFM1 en leche, por lo que existe la necesidad de desarrollar estrategias innovadoras que permitan superar los límites de cuantificación actualmente existentes para esta micotoxina. Dicha sensibilidad podría verse incrementada si el hapteno utilizado en la preparación de los antígenos de ensayo fuese diferente al empleado para la obtención de los anticuerpos (haptenos y conjugados heterólogos).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención aporta una solución a la limitada sensibilidad de los actuales métodos inmunoanalíticos para la determinación de AFM1 al proporcionar un método para la preparación de antígenos de ensayo heterólogos, es decir, de bioconjugados en los que el hapteno acoplado a la proteína posee una estructura ligeramente diferente de la del hapteno utilizado en la generación del anticuerpo. El fundamento de la invención reside en el descubrimiento, no previamente conocido, de que un hapteno consistente en solo cuatro de los cinco anillos que constituyen la estructura de las aflatoxinas puede ser reconocido, tras su acoplamiento a proteínas, enzimas, soportes y marcadores químicos, por anticuerpos pre-existentes, lo que posibilita el desarrollo de procedimientos de inmunodetección de aflatoxinas con superiores prestaciones analíticas.

La presente invención supera muchos de los problemas de la técnica al proporcionar un método novedoso para un inmunoensayo de elevada detectabilidad, simple, rápido, económico y de alto rendimiento para la micotoxina AFM1. Los autores de esta invención han diseñado haptenos heterólogos para AFM1 basados en una estructura fragmentaria de esta micotoxina representada por el siguiente esqueleto (R)



25

que puede unirse covalentemente a la proteína portadora para formar el antígeno de ensayo competidor a través del grupo acilo, bien directamente o incorporando previamente a dicho grupo un brazo espaciador de longitud y características estructurales muy diversas.

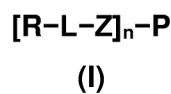
La estructura fragmentaria **R**, común a estos haptenos heterólogos de AFM1, se ha diseñado manteniendo las características estructurales y funcionales del núcleo central de esta micotoxina, e incorporado modificaciones relevantes en las posiciones proximal y distal del punto de conjugación a la proteína. Particularmente, se ha suprimido el anillo de 5 miembros de ciclopentanona en la posición proximal y se ha modificado la funcionalización del anillo de dihidrofurano en la posición distal, transformándolo en uno de gamma-butirolactona y suprimiendo el grupo hidroxilo angular.

Los autores de esta invención han demostrado que los antígenos de ensayo derivados de estos haptenos heterólogos pueden ser reconocidos por anticuerpos generados frente a conjugados inmunogénicos que incorporan la estructura íntegra de AFM1. Dicho reconocimiento, aunque elevado, es claramente inferior al que muestran los mencionados anticuerpos hacia el conjugado homólogo. Esta diferencia de reconocimiento posibilita el desarrollo de un inmunoensayo heterólogo ultrasensible y específico para AFM1 que mejora claramente las prestaciones de los inmunoensayos que utilizan antígenos basados en haptenos que mantienen íntegro el esqueleto de AFM1.

Aspectos de la invención

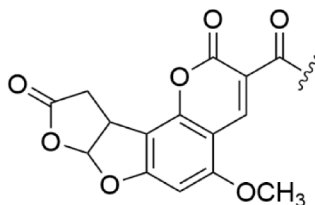
La presente invención proporciona bioconjugados y derivados marcados de análogos fragmentarios de aflatoxinas como antígenos de ensayo en métodos inmunoanalíticos.

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



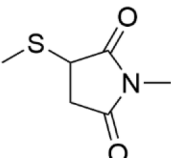
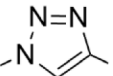
donde:

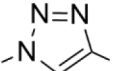
R es:



L es una cadena hidrocarbonada de 0 a 12 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende la sustitución de entre 0 y 6 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 0 a 6 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N, y más preferiblemente **L** es una cadena hidrocarbonada lineal saturada de 0 a 3 átomos de carbono y la cadena hidrocarbonada comprende de 0 a 1 heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O y N; y

Z es un grupo funcional seleccionado entre:

10 $-\text{NH}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-$, $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{N}(\text{alquilo})-$, $-\text{S}-$,
 $-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})-$,  y 

En una realización preferida, **Z** se selecciona del grupo que consiste en $-\text{NH}-$,
 15 $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$, y 

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,
 20 electrostática o de otro tipo, a un soporte. Dicho soporte puede ser un polímero sintético o no, o estar compuesto por nanomateriales como micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

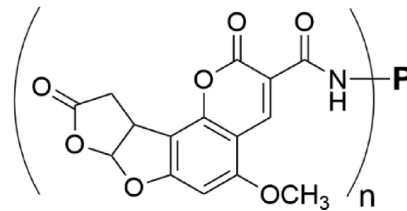
Según otra realización preferida de la presente invención, el bioconjugado de fórmula (I) descrito en esta solicitud de patente se caracteriza porque **P** se selecciona del grupo que
 25 consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina. Más preferiblemente **P** es albúmina, que puede ser albúmina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

n es un número con un valor entre 1 y 100; preferiblemente **n** es un valor entre 1 y 20.

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

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

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

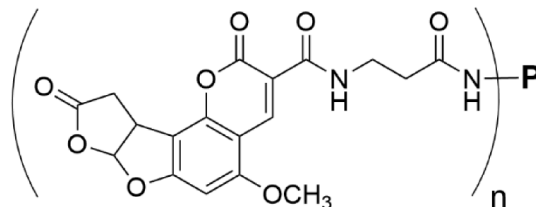


(Ia)

donde:

- 10 **P** y **n** se han definido anteriormente. Preferiblemente **P** es albúmina y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 20.

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



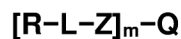
(Ib)

15

donde:

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

- 20 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):



(II)

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

Q es un marcador no isotópico detectable; y

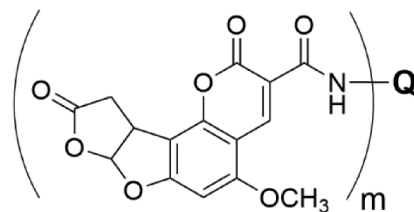
m es un número con un valor entre 1 y 100; preferiblemente **m** es un valor seleccionado entre 5 1 y 20.

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 trazadora no isotópica.

10 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 beta-galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, oxidasa, biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un
15 bpirilo 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.

El bioconjugado de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un derivado fragmentario de aflatoxina
20 basado en la estructura molecular **R** (hapteno) con **Q**, un marcador no isotópico, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

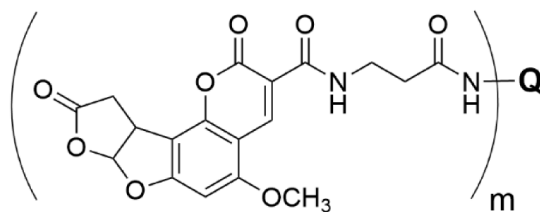
Según una realización preferida, el derivado de fórmula (II) es un derivado de fórmula (IIa)



(IIa)

25 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)

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

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso un bioconjugado de fórmula (I) como antígeno de ensayo o de un derivado marcado de fórmula (II) como antígeno enzimático o trazador, para, junto con un anticuerpo anti-AFM1, determinar de forma sensible y específica la presencia de AFM1 en una muestra mediante métodos inmunoquímicos, preferentemente mediante un inmunoensayo competitivo.
- 10 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de análisis *in vitro* de AFM1 en una muestra que comprende el uso de uno de los bioconjugados anteriormente descritos de fórmula (I) o (II) como antígeno de ensayo competidor.

Preferiblemente, este método comprende las siguientes etapas:

- 15 **a**) poner en contacto la muestra con un bioconjugado de fórmula (I) o (II) y un anticuerpo anti-AFM1; e
- b**) incubar la muestra de la etapa (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar la reacción inmunoquímica competitiva; y
- 20 **c**) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b) de manera que si se detecta reacción inmunoquímica, se concluye que existe AFM1 en la muestra y, en caso contrario, se concluye que no existe AFM1 en dicha muestra.

El tiempo de incubación de la etapa b) es preferiblemente de entre 5 y 500 minutos.

- En una realización particular, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando como competidor un bioconjugado de 25 fórmula (I) o un derivado marcado de fórmula (II).

El método de la presente invención permite la determinación cuantitativa del contenido de la micotoxina AFM1 en una muestra. Así mismo, el método de la presente invención permite

analizar el contenido de AFM1 en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de alimentos, muestras medioambientales como agua y muestras biológicas aisladas como orina o suero. Preferentemente la presente invención proporciona un método de análisis *in vitro* de AFM1 en leche y sus derivados.

- 5 El término inmunoensayo hace referencia a un método de análisis en el que ocurre una reacción inmunoquímica para la detección o cuantificación de un analito. Los inmunoensayos competitivos son aquellos en los que el analito compite por otra molécula por la unión al anticuerpo.

En el contexto de la presente invención, el término “anticuerpo” se refiere a una
10 inmunoglobulina que un animal o una célula híbrida (como un hibridoma) sintetiza de forma específica contra un inmunógeno. Específicamente, el término “anticuerpo anti-AFM1” se refiere a una inmunoglobulina producida de forma específica contra un inmunógeno basado en la estructura íntegra de AFM1 y a la cual reconoce con gran afinidad. La producción de
15 estos anticuerpos se lleva a cabo utilizando métodos ampliamente conocidos en la técnica [Woychik et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **1984**, 48, 1096–1099; Chadseesuwana et al., *J. Food Drug Analysis*, **2016**, 24, 780–787; Li et al., *Toxins*, **2017**, 9, 172].

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

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

El término “inmunógeno” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia
25 que es reconocida como extraña por un organismo vivo y por lo tanto es capaz de producir o de generar una respuesta inmune en un huésped. En la presente invención, el inmunógeno es un bioconjugado de AFM1 (BSA–AFM1).

Un último aspecto de la presente invención también se refiere a un kit de detección de AFM1 que comprende un anticuerpo anti-AFM1, obtenido por métodos ampliamente conocidos en
30 la técnica, y al menos uno de los bioconjugados de fórmula (I), como antígeno de ensayo, o uno de los derivados marcados de fórmula (II), como antígeno enzimático o trazador, tal como se describen en la presente solicitud de patente.

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

5 A continuación, se ilustra con algunos ejemplos y figuras la forma en que puede efectuarse la preparación de varios bioconjugados de fórmula (I) y (II) que no pretenden que sean limitativos de la presente invención, y que sirven para mostrar no solo la forma en que puede efectuarse la preparación de los mismos sino también la efectividad de estos bioconjugados como antígenos de ensayo, junto con anticuerpos producidos frente a AFM1, en el desarrollo de un
10 inmunoensayo de elevada sensibilidad para la esta micotoxina. Los números en negrita hacen referencia a la correspondiente estructura que se muestra en los esquemas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Estructuras de las aflatoxinas más relevantes.

Fig. 2. Esquema de síntesis de los haptenos **AFh1** y **AFh2** y los correspondientes ésteres
15 activos.

Fig. 3. Espectros MALDI-TOF-MS de los bioconjugados de los haptenos heterólogos *AFh1* (línea punteada) y *AFh2* (línea rayada) con las proteínas *rHSA* (**A**) y *OVA* (**B**) y la enzima HRP (**C**). El espectro de la proteína o enzima de referencia correspondiente a cada bioconjugado se representa en línea continua. Los espectros de la Figura 3B corresponden al ion
20 doblemente cargado, $(m/z)^{2+}$

Fig. 4. Curvas de inhibición de AFM1 mediante ELISA competitivo indirecto empleando dos de los bioconjugados heterólogos reivindicados en esta patente (*OVA-**AFh1***, cuadrados, y *OVA-**AFh2***, triángulos) y un bioconjugado homólogo (*OVA-AFM1*, círculos) que incorpora el hapteno utilizado para producir el anticuerpo monoclonal AFM1#314, específico de AFM1.

25 EJEMPLOS

1. Técnicas generales

1.1. Reactivos, equipos y técnicas generales utilizadas en la preparación de los haptenos y bioconjugados.

Los disolventes orgánicos MeOH, DMF y DMSO y los reactivos comerciales se utilizaron
30 directamente del envase comercial sin previa purificación, a excepción del tetrahidrofurano (THF) que se destiló sobre Na y benzofenona en atmósfera de N₂ justo antes de usarse. Las

reacciones se monitorizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílice pre-recubiertas (espesor de capa de 0,25 mm, gel de sílice 60 F254) usando luz UV como agente de visualización y ácido fosfomolibdico etanólico o soluciones acuosas de molibdato de amonio cérico y calor como agentes de desarrollo. Las purificaciones cromatográficas en columna se realizaron usando gel de sílice 60 (tamaño de partícula 0,043–0,063 mm). Los espectros de RMN se registraron con un espectrómetro Bruker DPX300 a 300 MHz (^1H) y a 75 MHz (^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm utilizando el solvente residual como referencia interna en todos los casos, [(2,05 y 29,84) y (2,50 y 39,52) ppm, para los espectros de (^1H y ^{13}C) en acetona- d_6 y DMSO- d_6 , respectivamente]. Los grados de sustitución de carbono se establecieron mediante secuencias de pulsos DEPT. Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se registraron mediante un espectrómetro de masas Q-TOF premier equipado con una fuente de electrospray (Waters, Manchester, UK). Los datos obtenidos se expresan como relación masa/carga (m/z).

El análisis de los bioconjugados se realizó con un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo e ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF), modelo 5800 (ABSciex), en modo lineal positivo (1500 disparos para cada posición) en un rango de masa de 12.000–100.000 m/z .

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

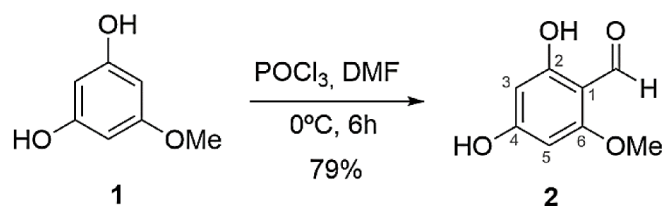
La AFM1 utilizada como standard analítico se obtuvo de Supelco (Merck-Sigma, Madrid, España; referencia CRM46319). La BSA (fracción V) fue de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). OVA, HRP, suero bovino, adyuvantes de Freund y TMB se adquirieron de Sigma/Aldrich (Madrid, España). Para la purificación de los bioconjugados de fórmula I y II se utilizaron columnas preempaquetadas de desalinización Sephadex G-25 HiTrapTM de GE Healthcare (Uppsala, Suecia) utilizando como tampón de elución fosfato sódico (PB) 100 mM, pH 7,4. Como anticuerpo secundario, se usó un antisuero policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón y marcado con peroxidasa (RAM-HRP) de Dako (Glostrup, Dinamarca). Se utilizaron placas Costar ELISA de poliestireno de 96 pocillos de alta unión y fondo plano de Corning (Corning, NY, EE. UU.). Las absorbancias del ELISA se leyeron con un PowerWave HT de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE.UU.). Los pocillos de microplacas se lavaron con un lavador ELx405 también de BioTek Instruments.

2. Preparación de bioconjugados de fórmula (I) y (II)

Ejemplo 2.1: Preparación de bioconjugados de fórmula (I) y (II) para **T = R**, sin cadena **L**, **Z = -NH-** y **P = rHSA** (albúmina sérica humana recombinante) y OVA (ovalbúmina) y **Q = HRP** (peroxidasa de rábano picante).

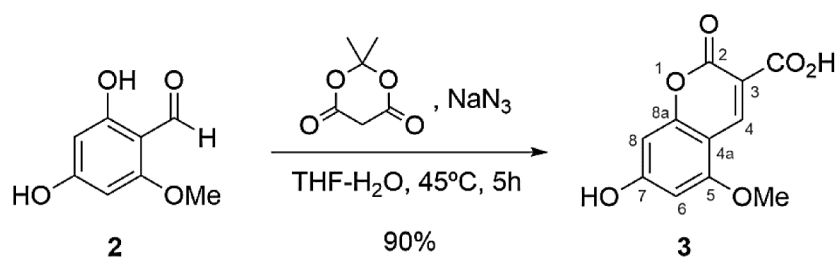
5 2.1.1. Preparación del hapteno **AFh1**.

2.1.1.1. Preparación de 2,4-dihidroxi-6-metoxibenzaldehído (**2**).



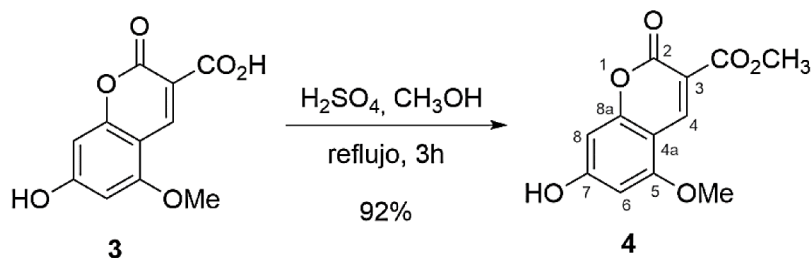
POCl₃ (1,67 mL, 17,84 mmol) se añadió sobre DMF anhidra (5 mL) a 0°C, la mezcla se dejó reaccionar a esta temperatura durante 30 minutos y sobre la misma se añadió lentamente una disolución de 5-metoxi-1,3-dihidroxibenceno (1,00 g, 7,14 mmol) en DMF (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo agitando a 0°C durante 20 horas; a continuación, la mezcla fría se trató con agua (10 mL), se dejó agitando a 0°C durante 30 minutos y luego se dejó alcanzar lentamente temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió de nuevo a 4°C y se dejó en reposo durante toda la noche, el sólido separado se filtró a vacío, se lavó con agua y se secó a vacío para obtener el aldehído **2** (660 mg, 55%) como un sólido ligeramente coloreado. Las aguas de filtrado y lavado se diluyeron con agua y se extrajeron con AcOEt, las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua, disolución acuosa al 1,5% de LiCl y salmuera, se secaron sobre MgSO₄. El residuo obtenido de la evaporación del disolvente (510 mg) se purificó por cromatografía de columna, utilizando CHCl₃ como eluyente, para obtener una cantidad adicional del aldehído **2** (283,7 mg, 24%). ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3,82 (3H, s, OCH₃), 5,86 (1H, dd, *J* = 2,0, 0,6 Hz, H-5), 5,99 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-3), 9,94 (1H, d, *J* = 0,6 Hz, CHO), 10,94 (1H, s, OH), 12,34 (1H, s, OH); ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 55,9 (OCH₃), 91,2 (C-3), 95,0 (C-5), 104,6 (C-1), 164,0 (C-6), 165,2 (C-4), 167,5 (C-2), 190,3 (CHO).

2.1.1.2. Preparación del ácido 7-hidroxi-5-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (**3**).



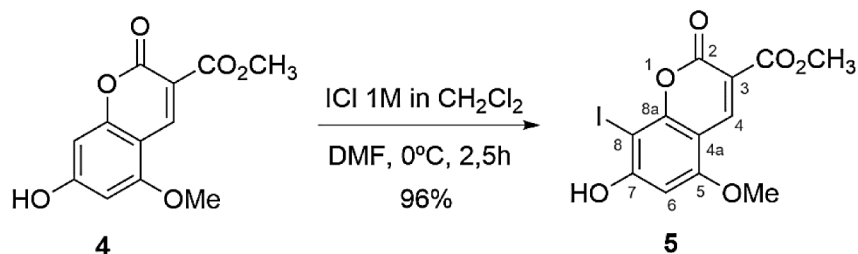
Se añadió agua (27,5 mL) a una mezcla del aldehído **2** (660 mg, 3,93 mmol), ácido de Meldrum (678 mg, 4,71 mmol) y azida sódica (127,8 mg, 1,965 mmol) bajo nitrógeno y la suspensión resultante se calentó con agitación a 45°C durante 10 minutos. A continuación, se añadió THF (7,7 mL) y la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 5 horas. Tras este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se trató con una disolución acuosa 0,5M de HCl (45 mL) y se dejó en reposo en la nevera. El precipitado formado se filtró a presión reducida, se lavó con agua fría hasta pH neutro y se secó a vacío durante toda la noche para obtener ácido cumarina-3-carboxílico **3** (837 mg, 90%) como un sólido amarillo pálido. Punto de fusión 269,5-270 °C (cristalizado de EtOH); ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3,90 (3H, s, OCH₃), 6,34 (1H, dd, *J* = 2,0, 0,7 Hz, H-6), 6,39 (1H, d, *J* = 2,0, H-8), 8,62 (1H, d, *J* = 0,7 Hz, H-4), 11,32 (1H, s ancho, 7-OH), 12,59 (1H, s ancho, CO₂H); ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ 56,4 (OCH₃), 94,8 (C-8), 95,7 (C-6), 101,8 (C-4a), 109,8 (C-3), 143,8 (C-4), 157,5 (C-2), 157,7 (C-8a), 158,6 (C-5), 164,2 (C-7), 165,6 (CO₂H); EMAR, calculado para C₁₁H₉O₆ [M+H]⁺ 237,0394, encontrado 237,0394.

15 2.1.1.3. Preparación de 7-hidroxi-5-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de metilo (**4**).



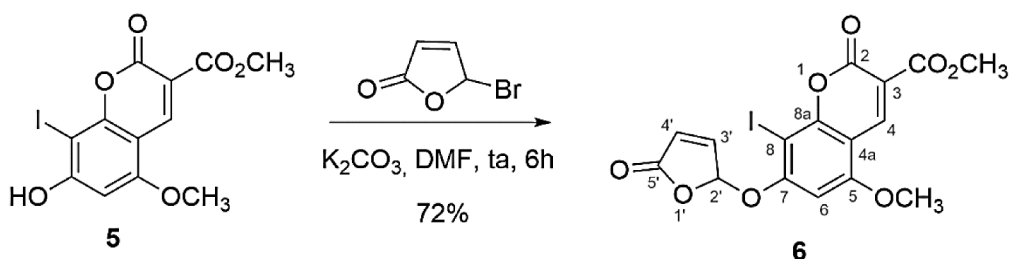
Una disolución de H₂SO₄ concentrado (0,28 mL) en CH₃OH anhidro (2 mL) se añadió gota a gota sobre una disolución agitada del ácido **3** (275,4 mg, 1,155 mmol) en CH₃OH (8,1 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La disolución resultante se calentó a reflujo durante 3 horas, se enfrió a temperatura ambiente, se vertió lentamente sobre agua (30 mL) y la suspensión resultante se dejó estar en reposo a 4°C en la nevera durante varias horas. El sólido precipitado se filtró a vacío, se lavó hasta pH neutro con agua y se secó a presión reducida toda la noche para obtener el éster metílico **4** (269,3 mg, 92%) un sólido anaranjado. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3,78 (3H, s, CO₂CH₃), 3,91 (3H, s, OCH₃), 6,34 (1H, dd, *J* = 2,0, 0,7 Hz, H-6), 6,38 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H-8), 8,62 (1H, d, *J* = 0,7 Hz, H-4), 11,22 (1H, s ancho, 7-OH); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 52,0 (CO₂CH₃), 56,4 (OCH₃), 94,8 (C-6), 95,7 (C-8), 101,6 (C-4a), 109,1 (C-3), 143,9 (C-4), 156,3 (C-2), 157,8 (C-8a), 158,7 (C-5), 163,4 (CO₂CH₃), 165,9 (C-7). EMAR, calculado para C₁₂H₁₁O₆ [M+H]⁺ 251,0550, encontrado 251,0551.

2.1.1.4. Preparación de 7-hidroxi-8-iodo-5-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de metilo (5).



Una disolución 1M de ICl en CH₂Cl₂ (1.45 mL, 1.43 mmol) se adicionó gota a gota sobre una disolución del derivado **4** (270,1 mg, 1,10 mmol) en DMF anhidra (5,5 mL) enfriada a 0°C en un baño de hielo bajo nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a la misma temperatura durante 2,5 horas, se dejó calentar a temperatura ambiente y se adicionó lentamente sobre agua (50 mL). La mezcla se enfrió a 4°C en la nevera durante unas horas y el sólido precipitado se filtró a vacío y el sólido obtenido se lavó con agua y se secó a vacío para obtener el ioduro **5** (404,6 mg, 96%) como un sólido granular anaranjado. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3,79 (3H, s, CO₂CH₃), 3,92 (3H, s, OCH₃), 6,54 (1H, s, H-6), 8,58 (1H, s, H-4), 12,02 (1H, s ancho, 7-OH); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 52,1 (CO₂CH₃), 56,4 (OCH₃), 63,6 (C-8), 94,6 (C-6), 102,4 (C-4a), 109,6 (C-3), 143,7 (C-4), 156,0 (C-2), 157,0 (C-8a), 158,4 (C-5), 163,1 (CO₂CH₃), 164,8 (C-7); EMAR, calculado para C₁₂H₁₀IO₆ [M+H]⁺ 376,9517, encontrado 376,9524.

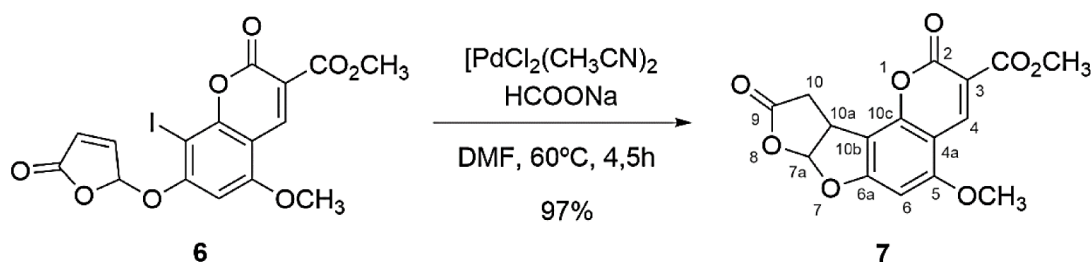
2.1.1.5. Preparación de 8-iodo-5-metoxi-2-oxo-7-((5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)oxi)-2H-cromeno-3-carboxilato de metilo (6).



5-Bromofurano-2(5H)-ona (229 mg, 1,40 mmol) se adicionó sobre una suspensión del ioduro **5** (402,6 mg, 1,068 mmol) y K₂CO₃ anhidro (162,7 mg, 1,177 mmol) en DMF anhidra (10 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, se vertió lentamente sobre agua (100 mL) y la suspensión resultante se dejó en reposo en la nevera a 4°C. El sólido separado se filtró por succión, se lavó con agua fría y se secó a vacío para obtener el acetal **6** (357,1 mg, 72%) como un sólido amarillento. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 3,82 (3H, s, CO₂CH₃), 4,04 (3H, s, OCH₃), 6,70 (1H, dd, J

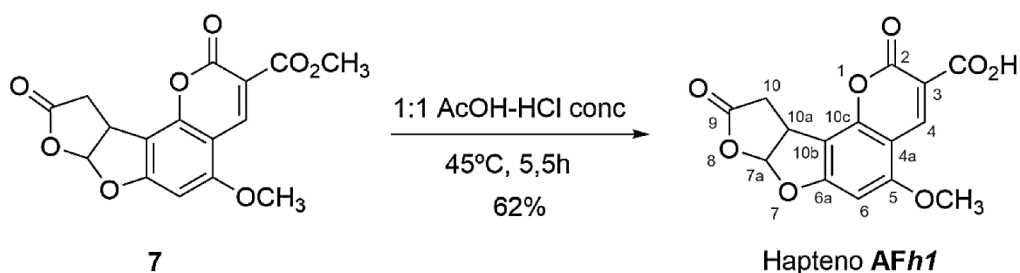
= 5,7, 1,2 Hz, H-4'), 7,02 (1H, s, H-6), 7,19 (1H, s ancho, H-2'), 7,96 (1H, dd, $J = 5,7, 1,3$ Hz, H-3'), 8,63 (1H, s, H-4); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 52,4 (CO_2CH_3), 57,1 (OCH_3), 66, 8 (C-8), 95,2 (C-6), 99,9 (C-2'), 105,0 (C-4a), 113,1 (C-3), 124,7 (C-4'), 143,2 (C-4), 151,6 (C-3'), 155,6 (C-8a), 156,1 (C-2), 158,6 (C-5), 161,1 (C-7), 162,8 (CO_2CH_3), 169,9 (C-5'); EMAR, calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{I}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 458,9571, encontrado 458,9570.

2.1.1.6. Preparación de 5-metoxi-2,9-dioxo-7a,9,10,10a-tetrahidro-2H-furo[3',2':4,5]furo [2,3-h]cromeno-3-carboxilato de metilo (**7**).



Una disolución del yoduro **6** (438,9 mg, 0,96 mmol), formiato de sodio (157,1 mg, 2,31 mmol) y *bis*(acetonitrilo)dicloro paladio(II) (51,4 mg, 0,20 mmol) en DMF anhidra (13 mL) se desgasificó exhaustivamente con ciclos de vacío- N_2 . La mezcla se agitó a 60°C durante 4,5 horas bajo atmósfera de nitrógeno, se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua (120 mL) y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución acuosa al 1.5% de LiCl y con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto tetracíclico **7** (306,8 mg, 97%) como un sólido parduzco. ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 2,83 (1H, dd, $J = 18,2, 2,2$ Hz, H-10), 3,26 (1H, dd, $J = 18,2, 9,8$ Hz, H'-10), 3,80 (1H, s, CO_2CH_3), 3,96 (1H, s, OCH_3), 4,43 (1H, ddd, $J = 9,8, 6,3, 2,2$ Hz, H-10a), 6,80 (1H, s, H-6), 6,82 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, H-7a), 8,65 (1H, s, H-4); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 32,2 (C-10), 39,2 (C-10a), 52,2 (CO_2CH_3), 57,1 (OCH_3), 91,2 (C-6), 103,8 (C-4a), 105,6 (C-10b), 109,2 (C-7a), 110,8 (C-3), 143,9 (C-4), 152,7 (C-10c), 155,4 (C-2), 159,7 (C-5), 163,1 (CO_2CH_3), 164,2 (C-6a), 174,1 (C-9); EMAR, calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 333.0605, encontrado 333.0595.

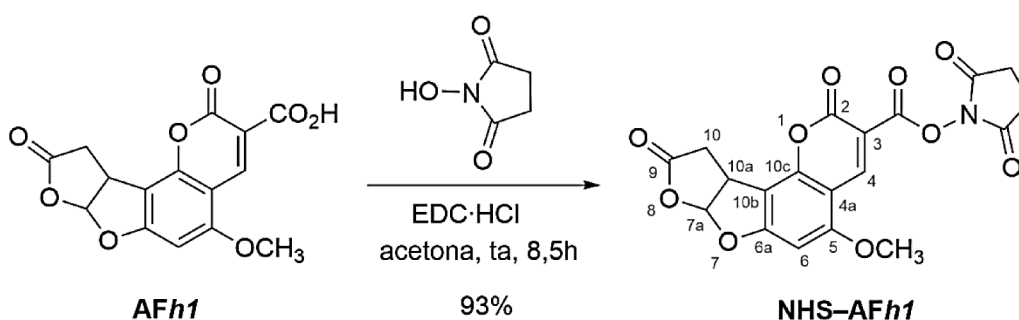
2.1.1.7. Preparación del ácido 5-metoxi-2,9-dioxo-7a,9,10,10a-tetrahidro-2H-furo[3',2':4,5]furo [2,3-h]cromeno-3-carboxílico (Hapteno **AFh1**).



Una disolución del éster metílico **7** (66,1 mg, 0,200 mmol) en una mezcla 1:1 de AcOH y ácido clorhídrico concentrado (4,5 mL) se agitó a 45°C durante 5,5 horas bajo nitrógeno. Una vez finalizada la reacción, cuya evolución se controló por cromatografía de capa fina utilizando una mezcla 95:5 de CHCl_3 y CH_3OH como eluyente, se enfrió a temperatura ambiente y se vertió gota a gota con agitación sobre agua (10 mL). La mezcla se dejó en reposo a 4°C y el sólido separado se filtró por succión, se lavó con agua y se secó a vacío durante toda la noche para proporcionar el hapteno **AFh1** (39,3 mg, 62%) como un sólido amorfo amarillento. ^1H RMN (acetona- d_6) δ 2,97 (1H, dd, $J = 18,2, 2,2$ Hz, H-10), 3,32 (1H, dd, $J = 18,2, 9,8$ Hz, H'-10), 4,10 (1H, s, OCH_3), 4,62 (1H, ddd, $J = 9,8, 6,3, 2,2$ Hz, H-10a), 6,78 (1H, s, H-6), 6,88 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, H-7a), 8,96 (1H, s, H-4); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 32,2 (C-10), 39,0 (C-10a), 57,1 (OCH_3), 91,2 (C-6), 104,0 (C-4a), 105,5 (C-10b), 109,2 (C-7a), 111,8 (C-3), 143,7 (C-4), 152,7 (C-10c), 156,2 (C-2), 159,7 (C-5), 163,9 (C-6a), 164,0 (CO_2H), 174,1 (C-9); EMAR, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 319,0448, encontrado 319,0451.

15 2.1.2. Preparación de los bioconjugados del hapteno **AFh1**.

2.1.2.1. Activación del hapteno **NHS-AFh1**, preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (**NHS-AFh1**).

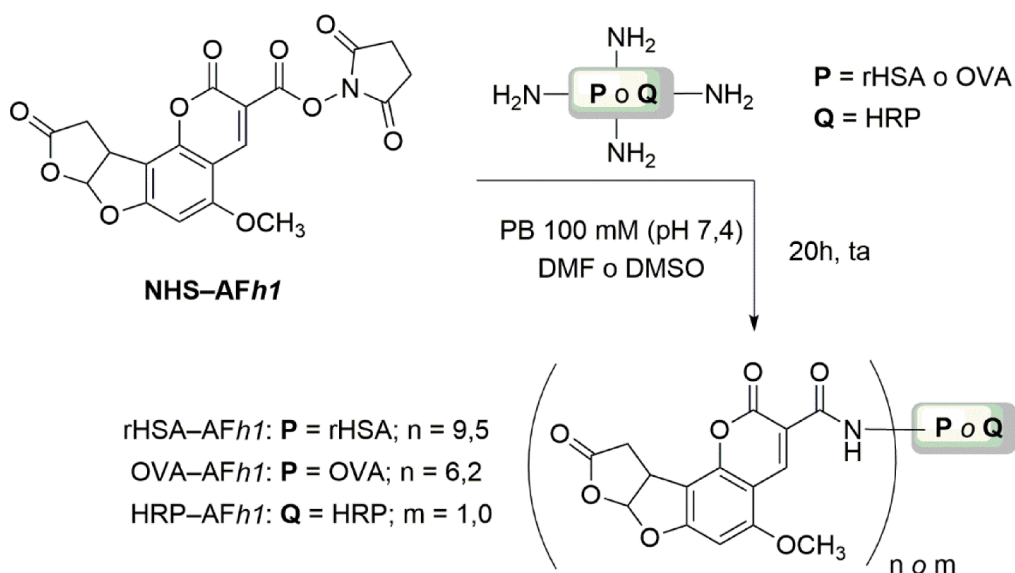


Una mezcla del hapteno **AFh1** (28,6 mg, 0,090 mmol), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida clorhidrato (21,1 mg, 0,11 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (11,4 mg, 0,10 mmol) en acetona seca (2,5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 8,5 horas bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se vertió gota a gota con agitación sobre agua (10 mL) y la suspensión resultante se enfrió a 4°C. El sólido separado se filtró por succión, se lavó con agua y se secó

a presión reducida durante toda la noche para obtener el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **NHS-AFh1** (34,6 mg, 93%) como un sólido verdoso. ¹H-RMN (DMSO-d₆) δ 2,86 (1H, dd, *J* = 18,3, 2,2 Hz, H-10), 2,87 (4H, s, COCH₂CH₂CO), 3,25 (1H, dd, *J* = 18,3, 9,8 Hz, H'-10), 3,99 (1H,s, OCH₃), 4,45 (1H, ddd, *J* = 9,8, 6,2, 2,2 Hz, H-10a), 6,86 (1H, s, H-6), 6,86 (1H, d, *J* = 6,2 Hz, H-7a), 8,84 (1H, s, H-4); ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 25,5 (COCH₂CH₂CO), 32,0 (C-10), 39,1 (C-10a), 57,4 (OCH₃), 91,6 (C-6), 104,2 (C-4a), 105,8 (C-10b), 106,0 (C-3), 109,5 (C-7a), 146,5 (C-4), 153,4 (C-10c), 154,9 (C-2), 158,6 (C-5), 160,5 (C-6a), 165,9 (CO₂N), 170,3 (COCH₂CH₂CO), 174,1 (C-9).

2.1.2.2. Preparación, purificación y caracterización de los bioconjugados del hapteno **AFh1**

(Bioconjugados tipo **Ia** y **Ila**).



2.1.2.2.1. Preparación del bioconjugado del hapteno **AFh1** con rHSA [rHSA-**AFh1**]. 45 µL de la disolución aproximadamente 50 mM en DMF del éster activo del hapteno **AFh1** obtenido en la reacción anterior (**NHS-AFh1**), se añadieron lentamente y con agitación sobre 0,9 mL de una disolución de rHSA (15 mg/mL) en PB 100 mM, pH 7,4. La reacción de conjugación se agitó suavemente durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el bioconjugado formado, rHSA-**AFh1**, se purificó por cromatografía de exclusión molecular en 3 columnas de desalinización Sephadex G-25 HiTrap™ de 5 mL acopladas, utilizando como tampón de elución PB 100 mM, pH 7,4. Tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que contenían el bioconjugado de rHSA se reunieron, se esterilizaron por filtración a través de un filtro de nylon de 0,45 µm y se llevaron a una concentración final de 0,9 mg/mL con tampón de elución filtrado y se almacenaron a -20 °C.

Para determinar la carga hapténica (n) obtenida en el bioconjugado, una alícuota de 100 µL del bioconjugado rHSA-**AFh1** purificado se dializó y el producto dializado se utilizó para calcular la eficiencia de la conjugación en términos del número medio de moléculas de hapteno **AFh1** acopladas por molécula de rHSA mediante MALDI-TOF-MS (n = 9,5, ver Tabla 1, entrada 1).

2.1.2.2.2. *Preparación del bioconjugado del hapteno **AFh1** con OVA [OVA-**AFh1**].* A partir de una disolución 50 mM en DMF del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno **AFh1** (**NHS-**AFh1****), se tomaron 100 µL y se añadieron lentamente y con agitación a un volumen de 1,80 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en PB 100 mM, pH 7,4. Después de 16 horas de reacción en agitación suave a temperatura ambiente, el bioconjugado formado se purificó como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado de rHSA. 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 °C. Una alícuota del bioconjugado OVA-**AFh1** recién purificado se dializó y el número medio de moléculas de hapteno conjugadas por molécula de OVA se determinó mediante MALDI-TOF-MS (n = 6,2, ver Tabla 1, entrada 2).

2.1.2.2.3. *Preparación del bioconjugado del hapteno **AFh1** con HRP [HRP-**AFh1**].* A partir de una disolución 5 mM de la mezcla del éster activo del hapteno **AFh1** en DMF, se tomaron 100 µL y se añadieron lentamente y con agitación sobre 0,9 mL de una disolución de HRP a una concentración de 3 mg/mL en tampón fosfato 100 mM, pH 7,4. La reacción de conjugación se agitó suavemente durante 16 horas a temperatura ambiente. Finalizada la conjugación, el trazador enzimático se purificó siguiendo el procedimiento descrito previamente para los bioconjugados de rHSA y OVA utilizando 2 columnas de desalinización Sephadex G-25 HiTrap™ de 5 mL. Una alícuota del bioconjugado HRP-**AFh1** recién purificado se dializó y el número medio de moléculas de hapteno conjugadas por molécula de HRP se determinó mediante MALDI-TOF-MS (m = 1,0, ver Tabla 1, entrada 3). El resto del trazador se llevó a una concentración de 0,5 mg/mL en PB con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenaron a 4 °C.

TABLA 1. Valores de la carga hapténica de los conjugados proteicos del hapteno **AFh1** determinados por MALDI-TOF-MS (Figura 3)

		<i>RM</i> ₀	<i>m/z</i> proteína referencia	<i>m/z</i>	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/hapteno$	<i>n o m</i>
1	rHSA- <i>AFh1</i>	11	66369	69230	2861	300	9,5
2	OVA- <i>AFh1</i>	8	24275#	25210#	935	300	6,2
3	HRP- <i>AFh1</i>	8	44034	44324	290	300	1,0

RM₀: relación molar inicial hapteno/proteína utilizada para la conjugación

n, m: relación molar hapteno/proteína obtenida para cada conjugado

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

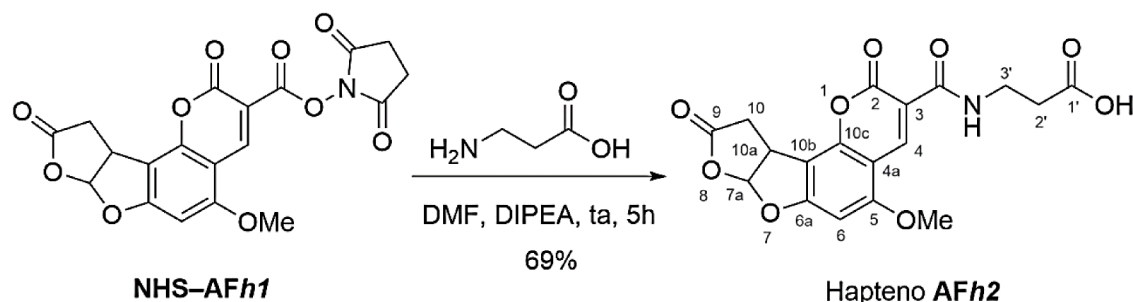
$\Delta m/hapteno$: incremento de masa por cada molécula de hapteno conjugada

correspondiente al ión doblemente cargado [M+2H]²⁺

Ejemplo 2.2: Preparación de bioconjugados de fórmula (I) y (II) para **T = R**, **L = NHCH₂CH₂**, **Z = –(C=O)NH–** y **P = rHSA** (albúmina sérica humana recombinante) y **OVA** (ovalbúmina) y **Q = HRP** (peroxidasa de rábano picante).

5 2.2.1. Preparación del hapteno **AFh2**.

2.2.1.1. Preparación del ácido 3-(5-metoxi-2,9-dioxo-7a,9,10,10a-tetrahidro-2H-furo [3',2':4,5]furo[2,3-h]cromeno-3-carboxamido)propanoico (Hapteno **AFh2**).

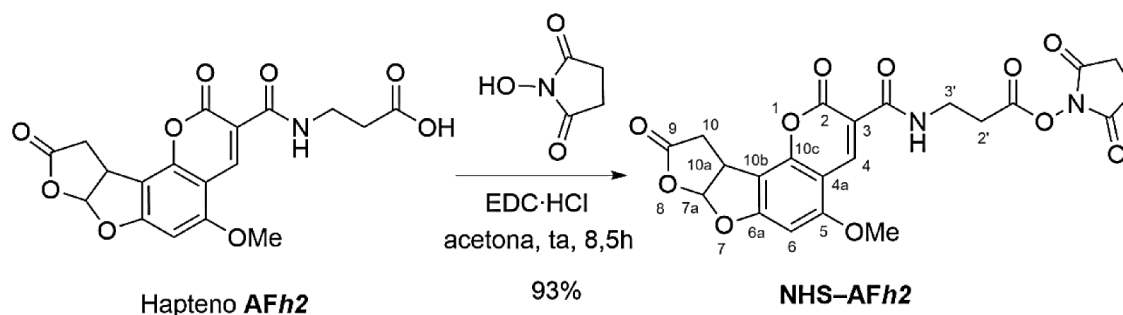


N-Etil-diisopropilamina (34 μ L, 0,198 mmol) se añadió sobre una disolución del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo NHS-*AFh1* (33 mg, 0,079 mmol) y β -alanina (13,8 mg, 0,155 mmol) en DMF anhidra (2,5, mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas, se diluyó con agua (25 mL), se acidificó lentamente con ácido cítrico hasta pH aproximadamente 3 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con agua, una disolución acuosa al 1,5% de LiCl y salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida para

obtener el hapteno **AFh2** (20,7 mg, 69%) como un sólido blanco. El producto mostró una pureza elevada (>90%), suficiente para ser empleado directamente para la preparación del correspondiente conjugado, pero fue cristalizado de CH₃OH en caliente para obtener una muestra analítica. Se obtuvieron 11,7 mg (39%) de cristales del hapteno **AFh2** puro y otros 8,9 mg (30%), algo más impuros como sólido amorfo, tras la eliminación de las aguas de cristalización y lavado. ¹H RMN (acetone-d₆) δ 2,64 (2H, t, *J* = 6,6 Hz, H-2'), 2,96 (1H, dd, *J* = 18,2, 2,2 Hz, H-10), 3,29 (1H, dd, *J* = 18,2, 9,7 Hz, H'-10), 3,67 (2H, m, H-3'), 4,06 (3H, s, OCH₃), 4,57 (1H, ddd, *J* = 9,7, 6,3, 2,2 Hz, H-10a), 6,70 (1H, s, H-6), 6,83 (1H, d, *J* = 6,3 Hz, H-7a), 8,87 (1H, s ancho, NH), 9,00 (1H, s, H-4), 10,5-11,5 (1H, s ancho, CO₂H); ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) δ 32,2 (C-10), 33,8 (C-2'), 35,1 (C-3'), 39,5 (C-10a), 57,2 (OCH₃), 91,6 (C-6), 104,6 (C-10b), 105,6 (C-4a), 109,2 (C-7a), 112,8 (C-3), 142,5 (C-4), 151,9 (C-10c), 159,7 (C-5), 160,2 (C-2), 161,2 (NHCO), 163,7 (C-6a), 173,2 (CO₂H), 174,1 (C-9); EMAR, calculado para C₁₈H₁₆NO₉ [M+H]⁺ 390,0820, encontrado 390,0820.

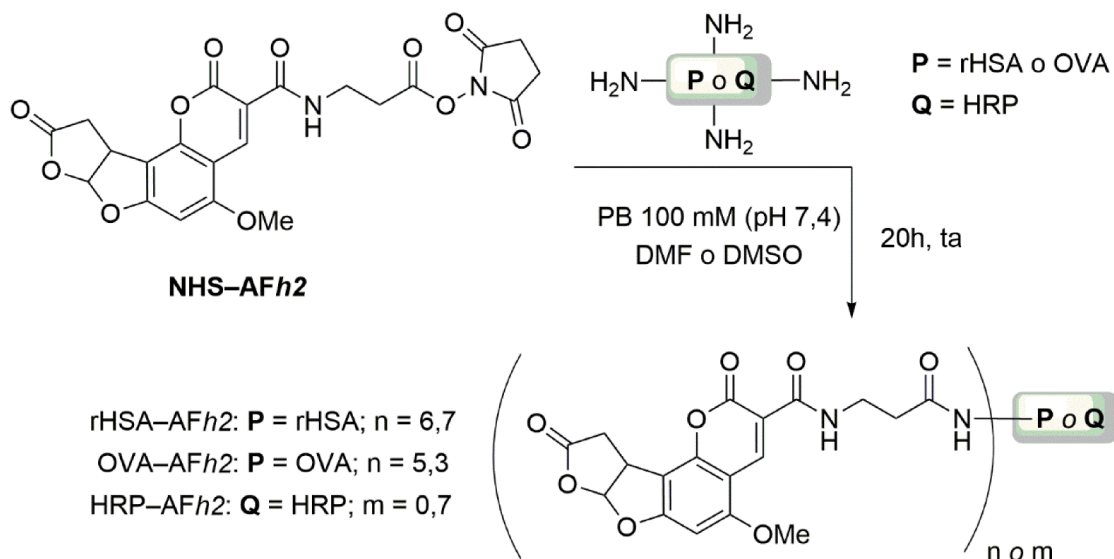
2.2.2. Preparación de los bioconjugados del hapteno AFh2.

2.2.2.1. Activación del hapteno **NHS-AFh2**, preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (**NHS-AFh2**).



Una disolución del hapteno **AFh2** (9,24 mg, 0,024 mmol), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida clorhidrato (5,3 mg, 0,028 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (3 mg, 0,026 mmol) en acetona anhidra (800 μL) se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (25 mL) y se lavó sucesivamente con agua, una disolución acuosa al 5% de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **NHS-AFh2** (9,9 mg, 97%) como un sólido amorfo incoloro. ¹H RMN (Acetona-*d*₆) δ 2,88 (4H, s, COCH₂CH₂CO), 2,96 (1H, dd, *J* = 18,3, 2,3 Hz, H-10), 3,02 (2H, t, *J* = 6,7 Hz, H-2'), 3,29 (1H, dd, *J* = 18,3, 9,8 Hz, H'-10), 3,80 (2H, m, H-3'), 4,07 (3H, s, OCH₃), 4,58 (1H, ddd, *J* = 9,8, 6,3, 2,3 Hz, H-10a), 6,61 (1H, s, H-6), 6,84 (1H, d, *J* = 6,3 Hz, H-7a), 8,91 (1H, singlete ancho, N-H), 9,02 (1H, s, H-4).

2.2.2.2. Preparación, purificación y caracterización de los bioconjugados del hapteno **AFh2** (Bioconjugados tipo **Ib** y **Iib**).



2.2.2.2.1. Preparación del bioconjugado del hapteno **AFh2** con rHSA [**rHSA-AFh2**].

5 Preparado siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el bioconjugado rHSA-**AFh1** (apartado 2.1.2.2.1) a partir de 90 μL de una disolución 25 mM en 1:1 DMF-DMSO del éster activo del hapteno **AFh2** (**NHS-AFh2**) y 0,9 mL de una disolución de rHSA (15 mg/mL) en PB 100 mM, pH 7,4. Tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que contenían el bioconjugado de rHSA se reunieron, se esterilizaron por filtración a través

10 de un filtro de nylon de 0,45 μm y se llevaron a una concentración final de 0,9 mg/mL con tampón de elución filtrado y se almacenaron a -20°C . El número medio de moléculas del hapteno **AFh2** conjugadas por cada molécula de rHSA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $n = 6,7$ (ver Tabla 2, entrada 1).

2.2.2.2.2. Preparación del bioconjugado del hapteno **AFh2** con OVA [**OVA-AFh2**].

15 Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado OVA-**AFh1** (apartado 2.1.2.2.2) a partir 200 μL de una disolución 25 mM en 1:1 DMF-DMSO del hapteno **AFh2** (**NHS-AFh2**) y 1,8 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en PB 100 mM, pH 7,4. 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°C . El

20 número medio de moléculas del hapteno **AFh2** conjugadas por cada molécula de OVA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $n = 5,3$ (ver Tabla 2, entrada 2).

2.2.2.2.3. Preparación del bioconjugado del hapteno **AFh2** con HRP [**HPP-AFh2**]. Preparado como se ha descrito anteriormente para el bioconjugado HRP-**AFh1** (apartado 2.1.2.2.3) a

partir de 100 μL de una disolución 5 mM del éster activo del hapteno **AFh2** en 1:9 DMF-DMSO, y 0,9 mL de una disolución de HRP (3 mg/mL) en PB 100 mM, pH 7,4. Tras la purificación cromatográfica, las fracciones obtenidas conteniendo el trazador se llevaron a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ en PB con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,02% (p/v) y se almacenaron a 4 $^{\circ}\text{C}$. El número medio de moléculas del hapteno **AFh2** conjugadas por cada molécula de HRP, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de $m = 0,5$ (ver Tabla 2, entrada 3).

TABLA 2. Valores de la carga hapténica de los conjugados proteicos del hapteno **AFh2** determinados por MALDI-TOF-MS (Figura 3)

		<i>RM</i> ₀	<i>m/z</i> proteína referencia	<i>m/z</i>	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/\text{hapteno}$	<i>n o m</i>
1	<i>rHSA</i> -AFh2	11	66369	68841	2472	371	6,7
2	OVA-AFh2	8	24275#	25251#	976	371	5,3
3	HRP-AFh2	8	44034	44217	183	371	0,5

RM₀: relación molar inicial hapteno/proteína utilizada para la conjugación

n, m: relación molar hapteno/proteína obtenida para cada conjugado

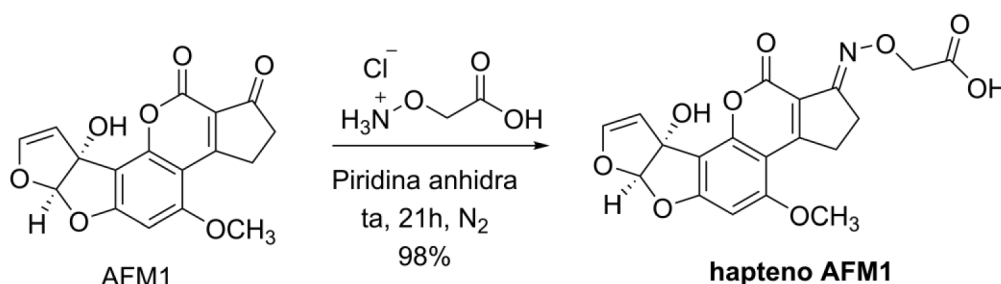
$\Delta(m/z)$: (*m/z* conjugado) – (*m/z* proteína de referencia)

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

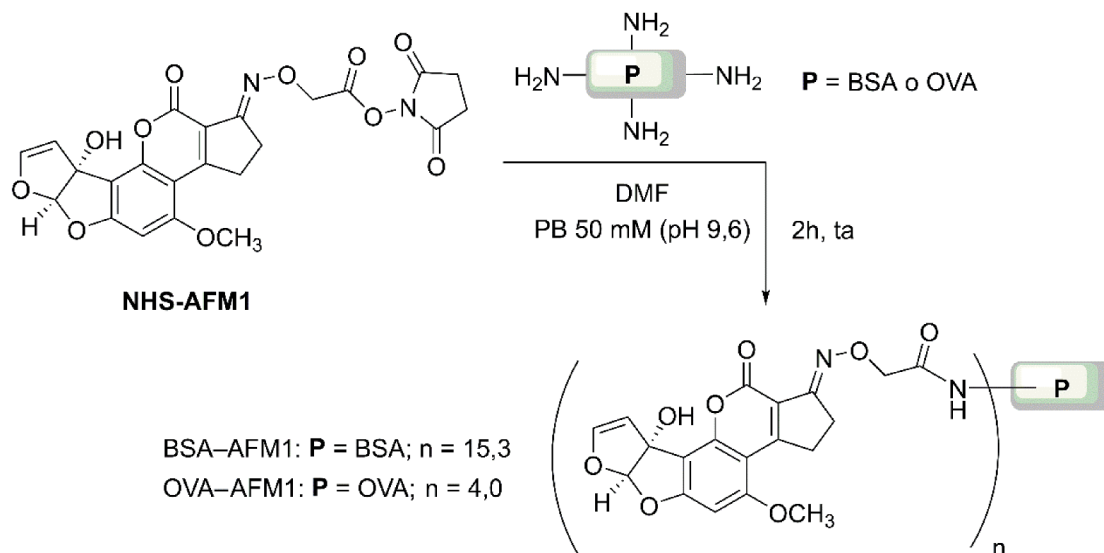
correspondiente al ión doblemente cargado $[M+2H]^{2+}$

3. Preparación del bioconjugado inmunizante BSA-AFM1

La obtención de anticuerpos monoclonales anti-AFM1 se llevó a cabo a través de un procedimiento bien establecido en el estado de la técnica para la preparación del correspondiente conjugado. En concreto, se llevó a cabo la preparación del hapteno AFM1 a partir de la propia aflatoxina, vía la incorporación de un brazo espaciador corto por reacción de condensación con el ácido 2-oxiaminoacético en medio básico que condujo directamente a la correspondiente oxima, el hapteno AFM1.



Posteriormente, el hapteno AFM1 se activó a través de la formación del correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo mediante la reacción con el clorhidrato de la carbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente. El hapteno AFM1 activado (NHS-AFM1) se acopló covalentemente a BSA y OVA en condiciones similares a las empleadas para la preparación de los bioconjugados de fórmula (I) y (II). Tras la purificación cromatográfica, el número medio de moléculas del hapteno AFM1 conjugadas por cada molécula de BSA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de 15,3. En cuanto al conjugado OVA-AFM1, el número medio de moléculas del hapteno AFM1 conjugadas por cada molécula de OVA, determinado por MALDI-TOF-MS, fue de 4,0



4. Producción de anticuerpos monoclonales de ratón

Para la inmunización de ratones con el bioconjugado BSA-AFM1 se utilizaron hembras de ratón BALB/c, con una edad al inicio del proceso comprendida entre 6 y 8 semanas. En cada dosis se administró por vía intraperitoneal 100 μg de bioconjugado por ratón, siendo el volumen total administrado 200 μL . En la primera inmunización se 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 ambos casos emulsionando los bioconjugados con adyuvante de Freund incompleto. Cuatro días antes de la fusión celular, el ratón seleccionado recibió una última dosis de 100 μg del bioconjugado BSA-AFM1 diluido en PBS.

La fusión celular con el ratón elegido se llevó a cabo siguiendo metodologías previamente descritas y bien establecidas en el estado de la técnica [Mercader et al., *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 7682–7690]. Se empleó la línea de mieloma P3-X63-Ag8.653, una relación linfocito:mieloma 4:1 y PEG1500 como agente fusionante. La población celular resultante se sembró en placas de cultivo de 96 pocillos (100 µL por pocillo) a una densidad celular de 150×10^3 linfocitos por pocillo, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y un 95% de humedad. 24 h después de la fusión, se añadió 100 µL por pocillo de medio HAT para selección de hibridomas.

Aproximadamente 10–12 días después de la fusión celular se llevó a cabo la evaluación de los sobrenadantes de los pocillos cultivados con objeto de identificar cuáles contenían hibridomas secretores de anticuerpos capaces de reconocer a AFM1 con elevada afinidad. Como resultado de este proceso se identificó un hibridoma, al que se le asignó el código AFM1#314, que cumplía con las propiedades de unión deseadas para un anticuerpo potencialmente útil para el desarrollo de un inmunoensayo de elevada sensibilidad para AFM1. Este hibridoma se clonó por el método de dilución límite y se creció *in vitro* hasta obtener células suficientes para la crioconservación de la línea celular y sobrenadante de cultivo a partir del cual purificar el anticuerpo. El volumen de sobrenadante recogido se centrifugó para eliminar los restos celulares y se purificó mediante precipitación con sulfato amónico y posterior cromatografía de afinidad con columnas de proteína G siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se determinó la concentración del anticuerpo obtenido mediante espectrofotometría UV y se preparó una disolución de trabajo a una concentración de 500 µg/mL en PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0,01% (p/v), que se almacenó a 4 °C. La disolución restante se precipitó con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)].

5. Procedimiento ELISA

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. El anticuerpo monoclonal AFM1#314, obtenido a partir del bioconjugado BSA–AFM1, se evaluó mediante ELISA competitivo en el formato de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta. Se emplearon como antígenos de ensayo tanto conjugados heterólogos, es decir, bioconjugados de fórmula (I) en los que P = OVA, como el bioconjugado homólogo OVA–AFM1. Después de cada etapa de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con una disolución de lavado. La señal producida por la peroxidasa utilizada como marcador se reveló con 100 µL por pocillo de TMB. Tras 10 min a temperatura ambiente, la reacción enzimática se paró añadiendo 100 µL por pocillo de ácido sulfúrico 1 M. Al finalizar los ensayos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 450 nm usando una longitud de onda de referencia de 650 nm. Las curvas patrón de tipo

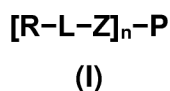
sigmoide obtenidas al representar la absorbancia frente a la concentración de analito se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando el paquete informático SigmaPlot de SPSS (Chicago, EE.UU.). La afinidad del anticuerpo hacia AFM1 se estimó a partir del valor de IC_{50} , es decir, la concentración de analito libre capaz de reducir a la mitad la señal máxima del ensayo (A_{max}).

6. Resultados

En la Figura 4 se muestra el reconocimiento hacia AFM1 del anticuerpo monoclonal AFM1#314. Las curvas de inhibición se obtuvieron mediante ELISA competitivo indirecto utilizando como antígenos de tapizado los bioconjugados heterólogos OVA-**AFh1** y OVA-**AFh2**, así como el conjugado homólogo OVA-AFM1. Como se puede observar, los 3 conjugados son excelentemente reconocidos por el anticuerpo monoclonal, pero mientras el valor de IC_{50} de la curva obtenida con el conjugado homólogo OVA-AFM1 es de 0.191 nM, en el caso de los conjugados heterólogos de fórmula (I) los valores de IC_{50} fueron de 0.052 y 0.032 nM con OVA-**AFh1** y OVA-**AFh2**, respectivamente. Así pues, la afinidad del anticuerpo monoclonal AFM#314 hacia la micotoxina AFM1 es entre 3,7 y 6,0 veces superior empleando los bioconjugados de fórmula (I) objeto de esta patente que el conjugado homólogo, confirmando así la validez de la hipótesis de partida y la utilidad de los bioconjugados basados en los haptenos **AFh1** y **AFh2**. Merece la pena destacar que el inmunoensayo basado en la combinación del anticuerpo AFM1#314 junto con el bioconjugado OVA-**AFh2** presenta un límite de cuantificación para AFM1 de 8 pM, equivalente a 2,63 pg/mL, un valor 19 veces inferior al límite máximo establecido en la Unión Europea para AFM1 en leche. Esta extraordinaria detectabilidad, muy probablemente la más elevada descrita hasta la fecha para esta micotoxina, ha sido posible gracias al bioconjugado de fórmula (I), y convierte a este inmunoensayo en una excelente herramienta analítica para el control rápido, sencillo, sensible y portátil de la micotoxina AFM1 en leche y productos derivados.

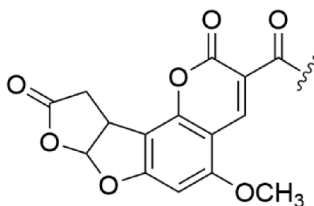
REIVINDICACIONES

1. Un bioconjugado de fórmula (I):



5 donde:

R es:



10 L es una cadena hidrocarbonada de 0 a 12 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende la sustitución de entre 0 y 6 átomos de carbono por heteroátomos, que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

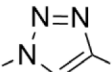
Z es un grupo funcional seleccionado entre:

15 -NH-, -(C=O)NH-, -NH(C=O)-, -O(C=O)NH-, -NH(C=O)NH-, -N(alquilo)-, -S-,
-NH(C=NH)-,

20 P es un péptido o polipéptido, natural o sintético, de peso molecular mayor de 2000 daltons;

n es un número con un valor entre 1 y 100.

- 25 2. El bioconjugado de fórmula (I) según la reivindicación 1 caracterizado porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 6 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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

5

4. El bioconjugado de fórmula (I) según las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 3 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 1 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

10

5. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque **Z** es -(C=O)NH-.

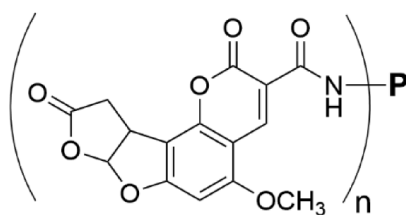
15

6. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina.

20

7. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque **n** es un valor entre 1 y 20.

8. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, con la fórmula (Ia)

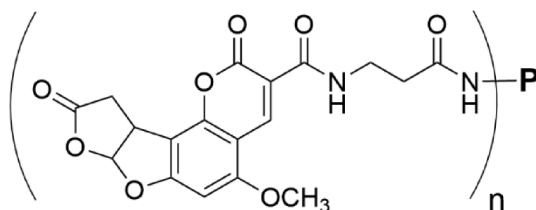


(Ia)

25

donde **P** es albúmina y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 20.

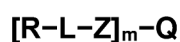
9. El bioconjugado de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, con la fórmula (Ib)



(Ib)

donde **P** es albúmina y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 20.

5 10. Un derivado marcado de fórmula (II):

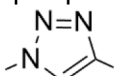


(II)

donde:

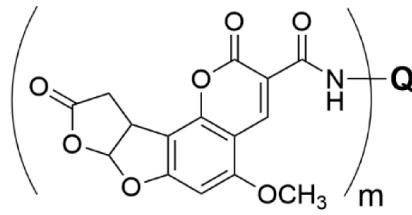
10 **R** y **L** se han definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; **Z** se definido en las reivindicaciones 1, 3 y 5; **Q** es un marcador detectable y **m** es un número con un valor entre 1 y 100.

15 11. El derivado marcado de fórmula (II), según la reivindicación 10, 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 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.

20 12. El derivado marcado de fórmula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en $-\text{NH}-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$, y 

25 13. El bioconjugado de fórmula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque **m** es un número con un valor entre 1 y 20.

14. El derivado marcado de fórmula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, con la fórmula (IIa)

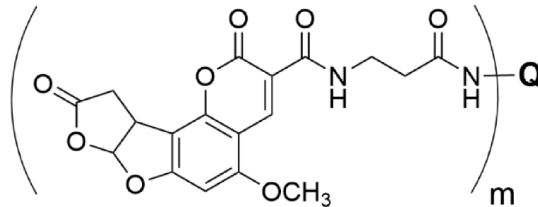


(IIa)

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

5

15. El derivado marcado de fórmula (II) según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, con la fórmula (IIb)



(IIb)

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

16. Método de análisis in vitro de AFM1 en una muestra que comprende el uso de un bioconjugado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o de un derivado marcado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.

15

17. Método según la reivindicación 16, que comprende las siguientes etapas:

a) poner en contacto la muestra con un bioconjugado de fórmula (I) o (II) y un anticuerpo anti-AFM1; y

20 **b)** incubar la muestra de la etapa (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar la reacción inmunoquímica competitiva; y

c) determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación de la etapa (b), de manera que si se detecta reacción inmunoquímica, se concluye que existe AFM1 en la muestra y, en caso contrario, se concluye que no existe AFM1 en dicha muestra.

25

18. Método según la reivindicación 17, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando como competidor un bioconjugado según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 5 19. Método según la reivindicación 17, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un ensayo competitivo, usando como competidor un derivado marcado según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.
- 10 20. Kit de detección y/o determinación de la micotoxina AFM1, que comprende un anticuerpo anti-AFM1 junto con un bioconjugado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o junto con un derivado marcado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15.

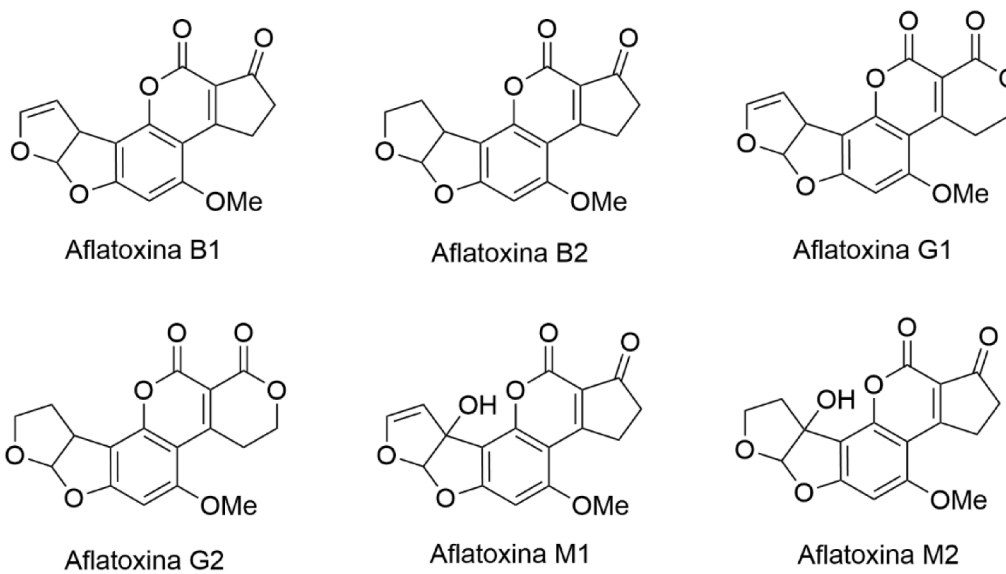


FIG. 1

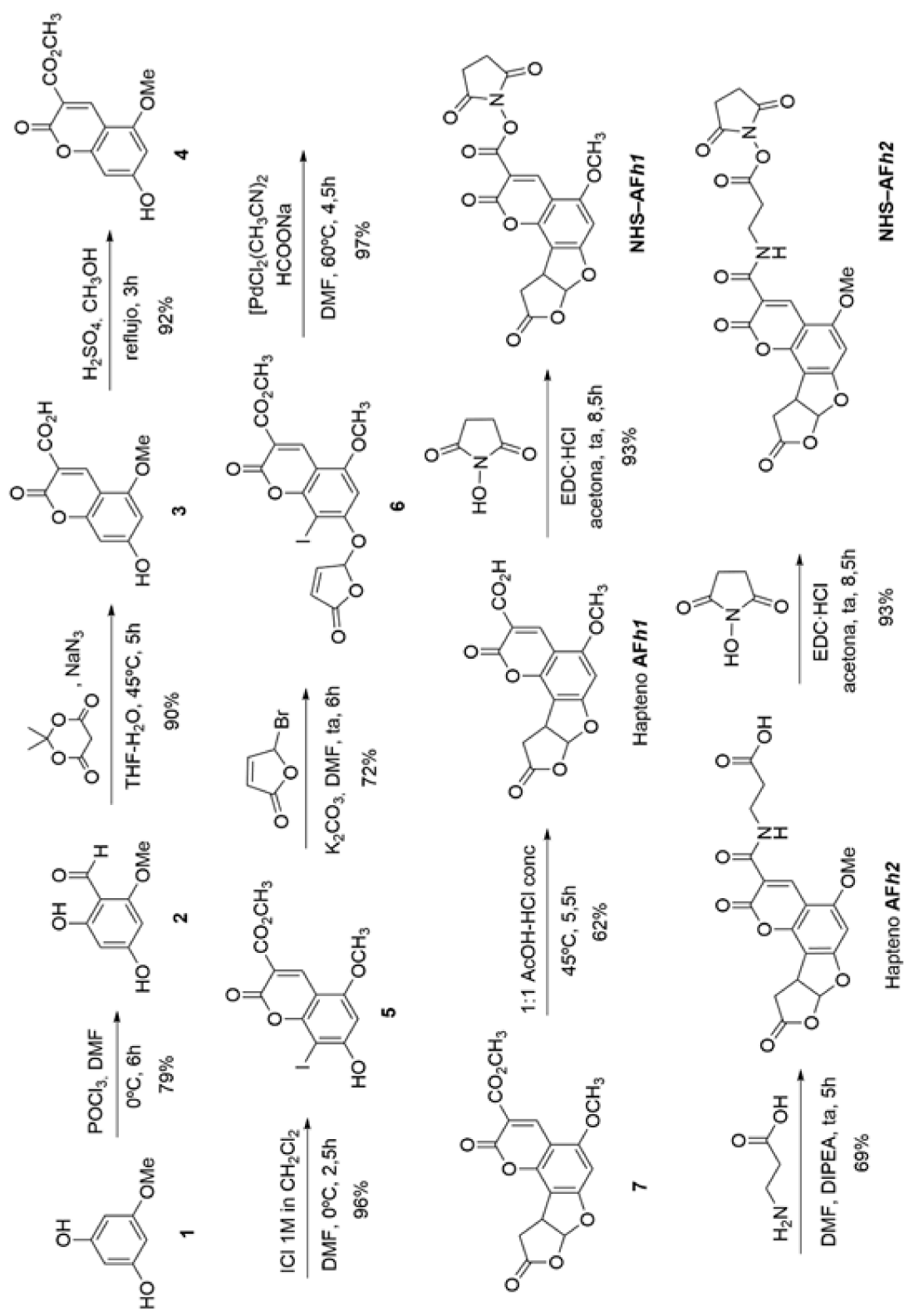


FIG. 2

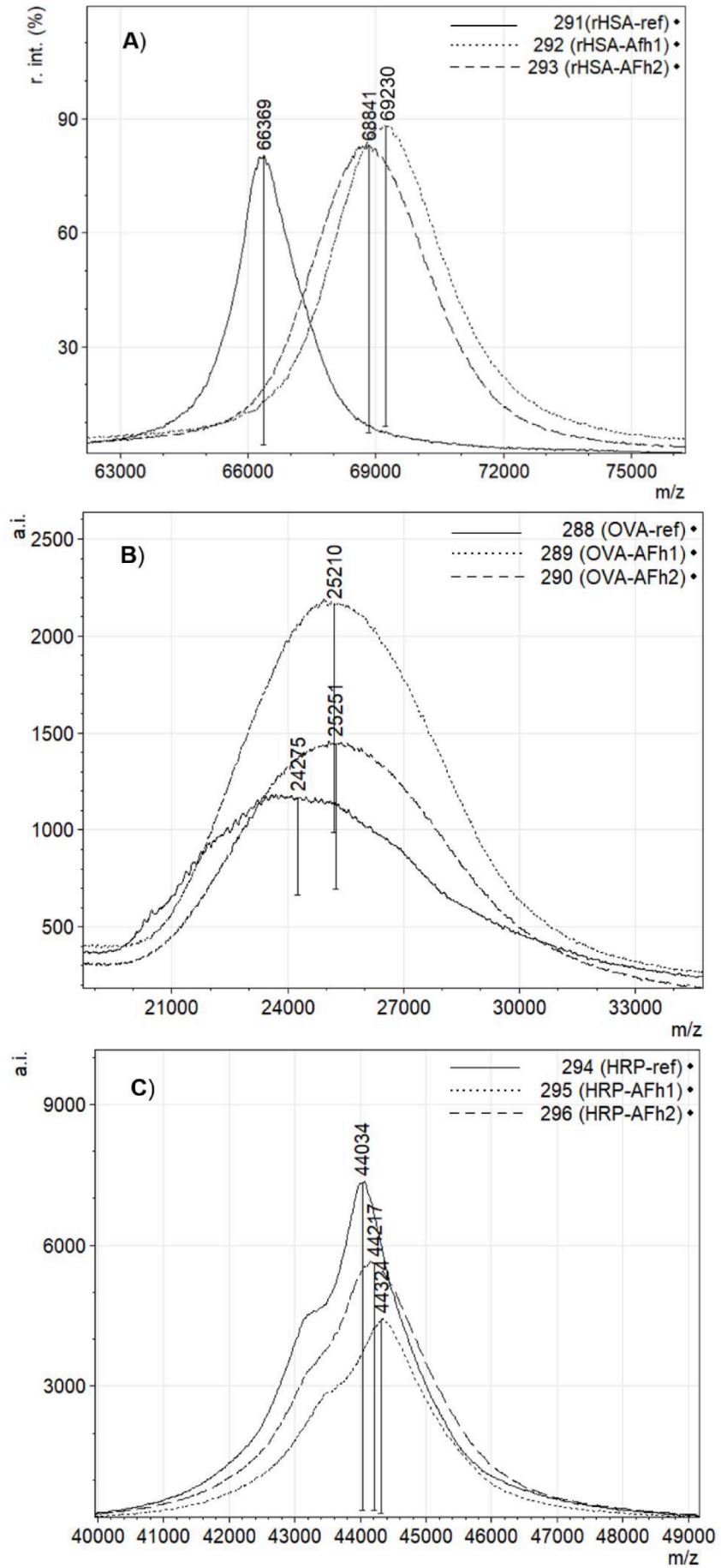


FIG. 3

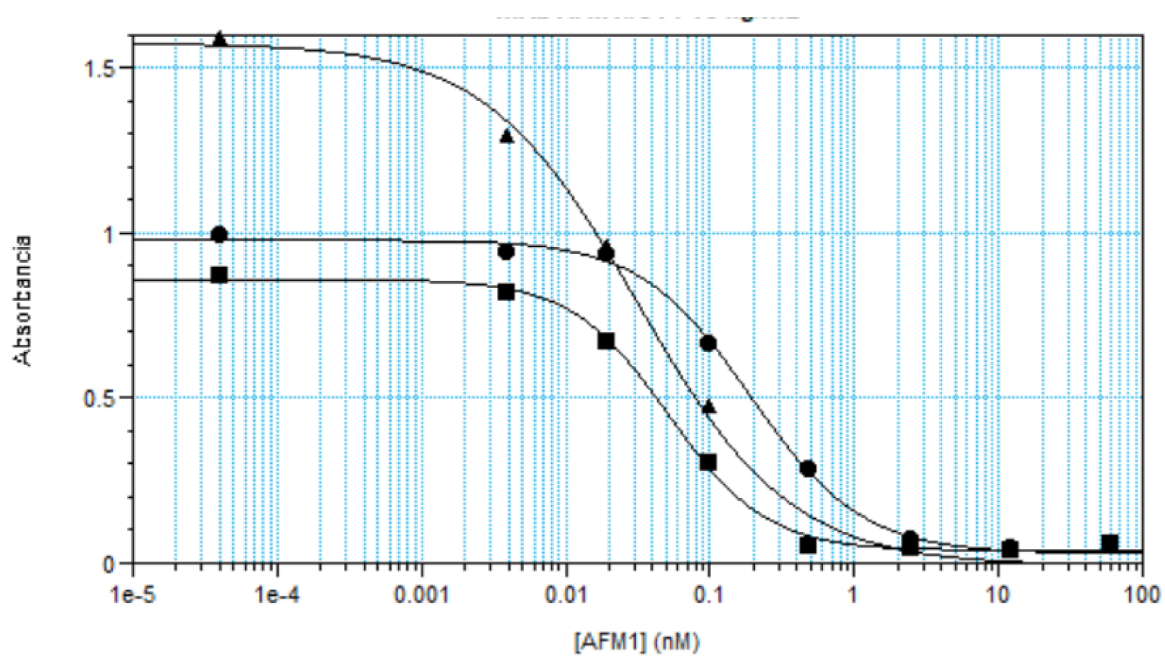


FIG. 4