

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 857**

21 Número de solicitud: 201031721

51 Int. Cl.:

**C07D 215/233** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**23.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.06.2012**

Fecha de la concesión:

**29.04.2013**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**13.05.2013**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MARCO COLAS, M<sup>a</sup> Pilar;  
SÁNCHEZ BAEZA, Francisco José y  
GONZÁLEZ PINACHO, Daniel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **HAPTENOS E INMUNOREACTIVOS Y SU USO EN LA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS DE FAMILIA E INMUNOENSAYOS PARA QUINOLONAS**

57 Resumen:

Haptenos e inmunoreactivos y su uso en la obtención de anticuerpos de familia e inmunoensayos para quinolonas.

La presente invención se refiere a haptenos, inmunógenos e inmunoreactivos secundarios, su uso para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra los antibióticos de tipo quinolona, su aplicación en técnicas inmunoquímicas de análisis y a un kit que permite la detección de dichos antibióticos en muestras biológicas procedentes de productos alimentarios de origen animal.

ES 2 383 857 B1

## DESCRIPCIÓN

Haptenos e inmunoreactivos y su uso en la obtención de anticuerpos de familia e inmunoensayos para quinolonas

La presente invención se refiere a haptenos, inmunógenos e inmunoreactivos secundarios, su uso para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra los antibióticos de tipo quinolona y su aplicación en técnicas inmunoquímicas de análisis de dichos antibióticos en muestras biológicas.

## ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La calidad nutricional de los alimentos, su disponibilidad y su seguridad son un elemento clave para el bienestar de la sociedad. La necesidad de aumentar la productividad animal ha originado el empleo, en ocasiones inapropiado, de fármacos veterinarios.

Más en concreto, los antibióticos de tipo quinolona se utilizan con fines terapéuticos, pero también profilácticos con el fin de prevenir enfermedades en explotaciones con elevada densidad de estabulación. De esta manera se incita el desarrollo de mecanismos de resistencia bacteriana, reduciendo drásticamente la eficacia del tratamiento, cuando dichas bacterias son el origen de enfermedades en humanos.

Por esta razón, la Agencia Europea para la Evaluación de los Productos Médicos (EMA), en la Directiva sobre el campo de la seguridad alimentaria 2377/90/CE, ha establecido límites máximos de residuos (MRLs, maximum residue limit) en los distintos productos alimenticios de origen animal. También ha impuesto a los laboratorios de inspección una serie de pautas de frecuencia de muestreo y número de sustancias a controlar antes de que estos productos lleguen al consumidor (Directiva 96/23/CE). Esto genera la necesidad de efectuar un número elevado de análisis.

Las técnicas actualmente utilizadas para la detección de quinolonas son principalmente la cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (CG-MS) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con diversos tipos de detección (principalmente ultravioleta y espectrometría de masas) (Hernández-Arteseros, *J. Chromatography A*. **2002**, 945, 1-24.). El principal inconveniente de estas técnicas es que precisan de una instrumentación compleja y personal cualificado, además de necesitar una preparación previa de la muestra, lo que prolonga el tiempo de análisis.

También se emplean ensayos de tipo microbiológico que, aunque de menor coste, la demora en la obtención de los resultados unida a su propia metodología, los convierte en inviables como métodos rápidos de alarma. Por lo tanto, los actuales métodos de análisis y preparación de muestra no responden adecuadamente a los requerimientos que la legislación exige para proteger la salud pública. Los procedimientos inmunoquímicos ofrecen importantes ventajas como procedimientos de cribado debido a su simplicidad, coste y elevadas capacidades de procesado.

Ya se han descrito diversos inmunoensayos genéricos para las quinolonas en la bibliografía. En todos los casos, el hapteno de inmunización era una quinolona comercial unida a una proteína inmunogénica mediante el ácido carboxílico en la posición 3 (Holtzapfle, *Food and Agric. Immunol.* **1997**, 9, 13-26; Bucknall, *Food Additives and Contaminants*. **2003**, 20, 221-228; Wang, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4471-4483) o mediante el resto de piperacina en la posición 7 (Huet, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2822-2827), bloqueando de esta forma epítomos comunes e importantes de la familia de las quinolonas.

La técnica anterior no aborda el método de unir el hapteno de quinolona al soporte inmunogénico a través de la posición 1. De esta manera, los haptenos conservarían todos los epítomos característicos de las quinolonas, maximizando su exposición al sistema inmune del animal huésped y manteniendo a su vez intactas las propiedades ácido base de este tipo de compuestos.

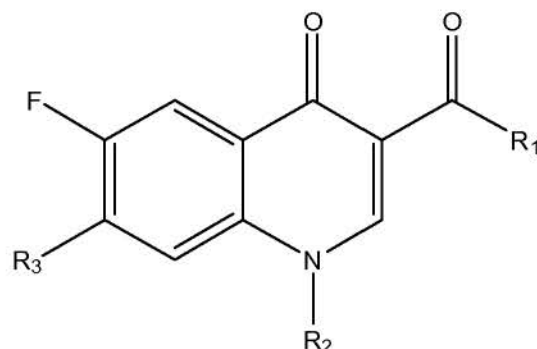
La presente invención proporciona dichos haptenos y los inmunoreactivos derivados de estos, que son útiles en la obtención de anticuerpos de familia mejorados contra quinolonas y que proporcionan mejores prestaciones cuando se utilizan en inmunoensayos para la detección de quinolonas.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un conjunto de haptenos estructuralmente relacionados, desde un punto de vista químico, con los antibióticos de tipo quinolona. De igual modo se refiere a los inmunoreactivos resultantes de la unión de dichos haptenos a soportes inmunogénicos y al uso de estos en la obtención de anticuerpos con selectividad de clase para la familia de las quinolonas. A su vez se refiere a la utilización de alguno de dichos inmunoreactivos, a modo de inmunoreactivos secundarios, y de algún anticuerpo generado a partir de alguno de ellos, en métodos inmunoquímicos de análisis de quinolonas en muestras biológicas.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):

50



(I)

o sus sales, isómeros o solvatos,

donde

R<sub>1</sub> se selecciona entre OH, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, OR<sub>4</sub>, NHR<sub>4</sub>, donde R<sub>4</sub> es un soporte inmunogénico;

5 R<sub>2</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, donde m es un valor de 3 a 6 cuando R<sub>5</sub> se selecciona entre, O ó NH o m es un valor de 1 a 6 cuando R<sub>5</sub> es S y R<sub>6</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, alquil-arilo, R<sub>4</sub> o LR<sub>4</sub>, donde L es un compuesto de unión bifuncional;

10 R<sub>3</sub> se selecciona entre heterociclo, halógeno o NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, donde R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub>, se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, donde n es un valor de 1 a 6, R<sub>9</sub> se selecciona entre S, O ó NH y R<sub>10</sub> se selecciona entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, alquil-arilo, R<sub>4</sub> o LR<sub>4</sub>.

Preferiblemente, R<sub>1</sub> es O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y más preferiblemente O-etilo.

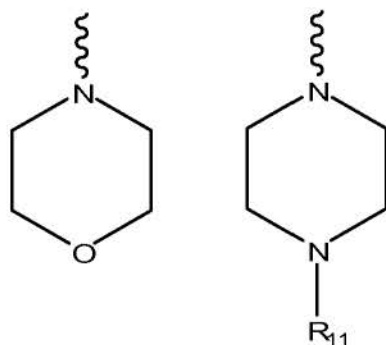
Preferiblemente, R<sub>1</sub> es OH.

15 Preferiblemente, R<sub>1</sub> es NHR<sub>4</sub>, donde R<sub>4</sub> es una proteína y más preferiblemente R<sub>4</sub> se selecciona entre albúmina de suero bovino (BSA), concanavalina A (CONA), ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante (HRP), hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) o hemocianina de cangrejo herradura (HCH).

Preferiblemente, R<sub>2</sub> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SR<sub>6</sub> donde R<sub>6</sub> se selecciona entre H o LR<sub>4</sub>, L se selecciona entre maleimidopropanoato y iodoacetilo y R<sub>4</sub> se selecciona entre BSA, CONA, HRP o HCH.

Preferiblemente, R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y más preferiblemente, R<sub>2</sub> es propilo.

20 Preferiblemente, R<sub>3</sub> se selecciona entre halógeno o heterociclo. Más preferiblemente, R<sub>3</sub> se selecciona entre flúor o cloro.



Preferiblemente, R<sub>3</sub> se selecciona entre el siguiente grupo:

donde R<sub>11</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y preferiblemente metilo.

Preferiblemente, R<sub>3</sub> es NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, donde R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> igual o diferente. Más preferiblemente R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> son etilo.

25 Preferiblemente, R<sub>3</sub> es NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, donde R<sub>7</sub> es H y R<sub>8</sub> es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido. Más preferiblemente, R<sub>3</sub> es -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

Preferiblemente, R<sub>3</sub> es -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHLR<sub>4</sub>, siendo L 2,4-dicloro-1,3,5-triazina y R<sub>4</sub> una proteína que se selecciona entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovoalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona del siguiente grupo:

- 5
- 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
  - 1-(3-(bencidriltilio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
  - 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
  - Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

10

    - Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
    - Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
    - Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
    - Ácido 7-(2-aminoetilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
    - Ácido 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

15

      - Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
      - Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacínil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
      - Ácido 6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
      - Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
      - Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacínil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

20

        - Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
        - Ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(carboxamida de BSA)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacínil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
        - Ácido 1-[3-(2-acetamida de HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacínil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
        - Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacínil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico

25

          - 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
          - 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
          - 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
          - 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
          - 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.

30

            - 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
            - Ácido 7-[2-(acetamida de BSA)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
            - 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
            - 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
            - 6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.

35

              - 6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
              - Ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5,-triazin-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

o sus sales, isómeros o solvatos,

5 En la presente invención se entiende como "alquilo" radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno (denominándose haloalquilo), hidroxilo, alcoxilo, arilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquilito.

El término "arilo", solo o en combinación, se refiere en la presente invención, a un sistema de anillo aromático mono o policíclico que contiene átomos de anillo de carbono. Los arilos preferidos son sistemas de anillo aromáticos de 5-10 miembros monocíclicos o bicíclicos, tales como fenilo o bifenilo que llevan opcionalmente uno o varios sustituyentes.

10 "Heterociclo" se refiere, en la presente invención, a un radical estable de anillo de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 4 a 8 miembros con uno o más heteroátomos, más preferiblemente un anillo de 5 ó 6 miembros con uno o más heteroátomos. Para los fines de esta invención, el heterociclo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados, y el átomo de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterocíclico puede estar opcionalmente oxidado, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente  
15 cuaternizado, y el radical heterocíclico puede estar parcial o totalmente saturado o ser aromático. Ejemplos de tales heterociclos incluyen pero no se limitan a, azepinas, benzimidazol, benzotiazol, furano, isotiazol, indol, piperidina, piperazina, pirina, quinolina, tiadiazol, tetrahidrofurano, cumarina, morfolina, pirrol, pirazol, oxazol, isoxazol, triazol, imidazol, etc.

"Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

20 "Soporte inmunogénico" se refiere a aquellos materiales con la propiedad de generar con independencia una respuesta inmune en el animal huésped y que pueden estar unidos mediante enlace covalente a los haptenos descritos en la presente invención. El material soporte idóneo incluye, por ejemplo, compuestos poliméricos naturales o sintéticos, como por ejemplo polipéptidos, oligonucleótidos, también incluye proteínas, como por ejemplo, albúminas, seroproteínas, globulinas, lipoproteínas, hemocianinas. Ejemplos ilustrativos de soporte inmunogénico incluyen  
25 seroproteína bovina, ovalbúmina, concavalina A, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

Teniendo en cuenta que los compuestos de fórmula (I) poseen grupos y átomos susceptibles de perder o ganar cargas, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I) en forma de sal.

30 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), y más concretamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta fórmula general anteriormente descrita pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

35 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente para la obtención de anticuerpos de amplio espectro contra antibióticos del tipo quinolonas.

Algunos ejemplos de quinolonas son, pero sin limitación, marbofloxacino, enrofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, sarafloxacino, ácido oxolínico, flumequina, ofloxacino, danofloxacino o difloxacino.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de anticuerpo contra antibióticos del tipo quinolonas que comprende:

- a) activación de un soporte inmunogénico con un compuesto de unión bifuncional,
- b) conjugación del soporte inmunogénico activado en (a) con un compuesto de fórmula (I),
- c) inmunización de un animal no humano con el conjugado obtenido en (b),
- d) extracción de los anticuerpos generados en (c).

45 El soporte inmunogénico puede ser cualquier polímero sintético o natural, oligonucleótido, polipéptido o proteína para conjugación de haptenos conocida en el estado de la técnica aunque preferiblemente se selecciona entre las proteínas seroalbumina bovina, ovoalbumina, concanavalina A, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura, hemocianina de cangrejo herradura.

50 La activación del soporte inmunogénico se puede realizar mediante cualquier técnica bioquímica conocida aunque en el procedimiento de la presente invención preferiblemente se realiza haciendo reaccionar el soporte inmunogénico con ésteres de succinimida a modo de compuesto de unión bifuncional.

"Compuesto de unión bifuncional" se refiere a aquellos compuestos con dos grupos funcionales, generalmente en extremos opuestos de la molécula, capaces de reaccionar con otros grupos funcionales incorporados bien a los



haptenos o bien a los soportes inmunogénicos. Si los grupos funcionales con los que deben reaccionar son idénticos, son compuestos de unión homobifuncional y si los grupos con los que deben reaccionar son diferentes, son compuestos de unión heterobifuncional".

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenible por el procedimiento según se ha descrito.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los anticuerpos descritos para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario y más preferiblemente son muestras de leche.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso como inmunoreactivos secundarios de los compuestos de fórmula (I) descritos, en la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en una muestra biológica aislada. Preferiblemente esta muestra biológica procede de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario y más preferiblemente en muestras de leche.

15 "Inmunoreactivos secundarios" se refiere a aquellos reactivos necesarios en un inmunoensayo de competencia para la detección de moléculas de bajo peso molecular. Pueden ser antígenos de tapizado, los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato indirecto y en cuyo caso se unen al soporte sólido y compiten con el analito por el anticuerpo en disolución. Pueden ser trazadores, bien enzimáticos, fluorescentes, radioactivos..., los cuales se emplean en inmunoensayos de competencia en formato directo y en cuyo caso compiten en disolución con el analito por el anticuerpo inmovilizado sobre el soporte sólido.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona que comprende al menos un anticuerpo o un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente. Los componentes de este kit pueden estar unidos a distintos tipos de soportes conocidos en el estado de la técnica, tales como nitrocelulosa para un ensayo de tira o placas de poliestireno para ensayos ELISA. Asimismo, el kit también puede incluir otro tipo de componentes y reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis de la muestra problema.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de detección descrito anteriormente para la determinación y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en productos alimentarios de origen animal. Ejemplos ilustrativos de productos alimentarios de origen animal incluyen leche y sus derivados, huevos, carnes (músculo, riñón, hígado etc.) de diferentes especies animales.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## EJEMPLOS

### Síntesis de los haptenos

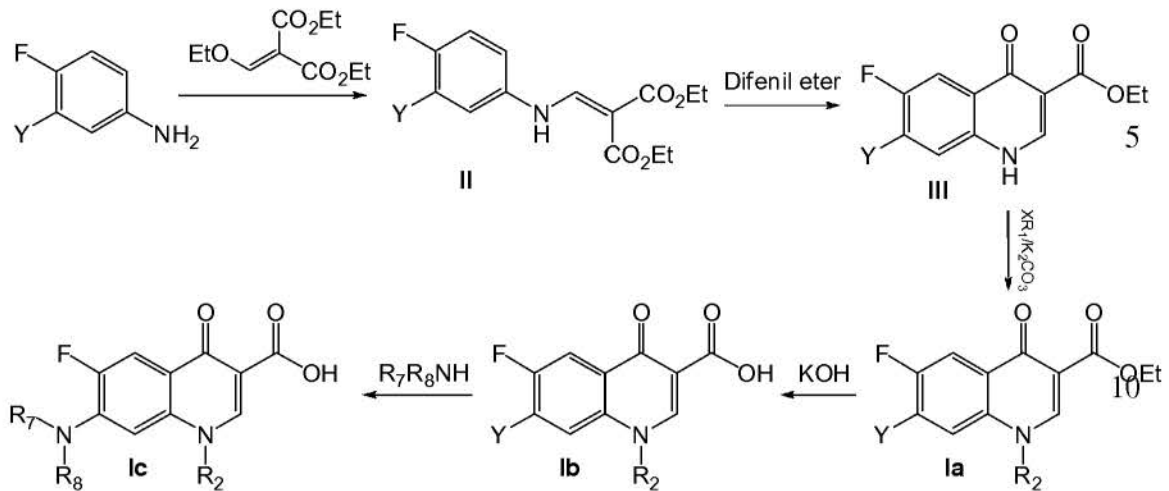
35 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, en particular por los procedimientos generales que se presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos descritos en la literatura.

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse a partir de los métodos y esquemas descritos a continuación:

40 Según el método de Goulds-Jacobs (véase esquema 1), la correspondiente anilina se hace reaccionar con etoximetilmalonato de dietilo en una reacción de adición-eliminación para obtener el malonato II. Seguidamente se hace reaccionar en difenil éter a alta temperatura para obtener la 4-oxoquinolina III. A continuación se alquila el nitrógeno quinolinico con un halogenuro en medio básico obteniéndose el 1-alkil(sustituido)-4-oxoquinolina Ia. Se hidroliza el éster en medio básico para obtener el correspondiente ácido carboxílico Ib que se hace reaccionar con una amina en una sustitución nucleófila aromática para obtener la 7-amino-4-oxoquinolina Ic.

45 En el caso de que la amina utilizada en la formación del compuesto Ic sea piperacina, se continua la secuencia metilando el nitrógeno piperacínico utilizando formaldehído y ácido fórmico o cualquier agente metilante como yoduro de metilo o sulfato de dimetilo.

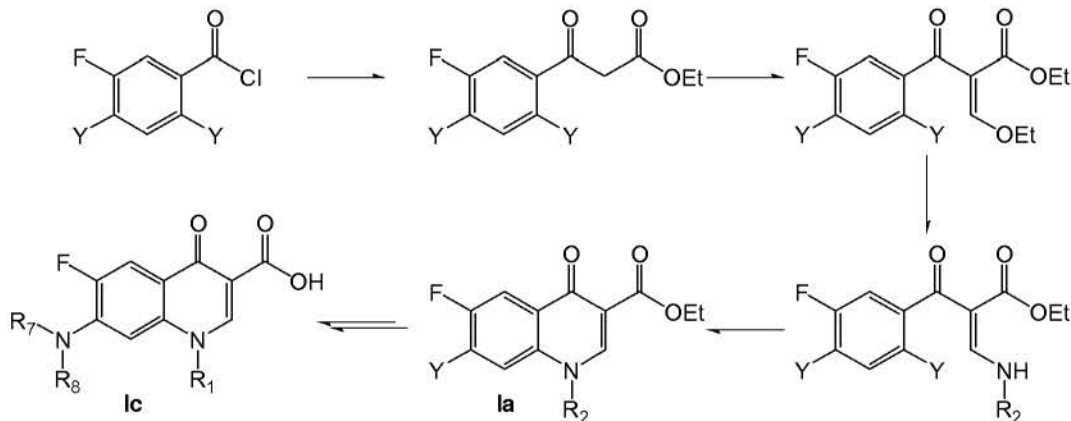
Esquema 1



15

Una estrategia alternativa para obtener los compuestos de fórmula I puede ser la de Grohe-Heitzer (véase esquema 2). En esta estrategia, se acila el correspondiente cloruro del ácido benzílico para obtener el éster malónico, que a su vez condensa en condiciones deshidratantes con un ortoéster para dar el éter enólico. Dicho éter sufre una reacción de adición-eliminación con la correspondiente amina primaria y el producto resultante, cicla en una reacción tandem de adición-eliminación en la posición orto.

Esquema 2.



20

Las aminas y los halogenuro de alquilo utilizados están disponibles comercialmente o se pueden obtener mediante métodos conocidos (March, *Advanced Organic Chemistry*. 1991, Ed. John Wiley & Sons).

Los tioles utilizados están disponibles comercialmente y su protección y desprotección se puede realizar mediante métodos conocidos (Green, *Protective Groups in Organic Chemistry*. 1999, Ed. John Wiley & Sons).

**Preparación de los inmunoreactivos**

25

Los inmunoreactivos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica e inmunoquímica, en particular por los procedimientos generales que se presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos descritos en la literatura.

a) Haptenos con grupo tiol

30

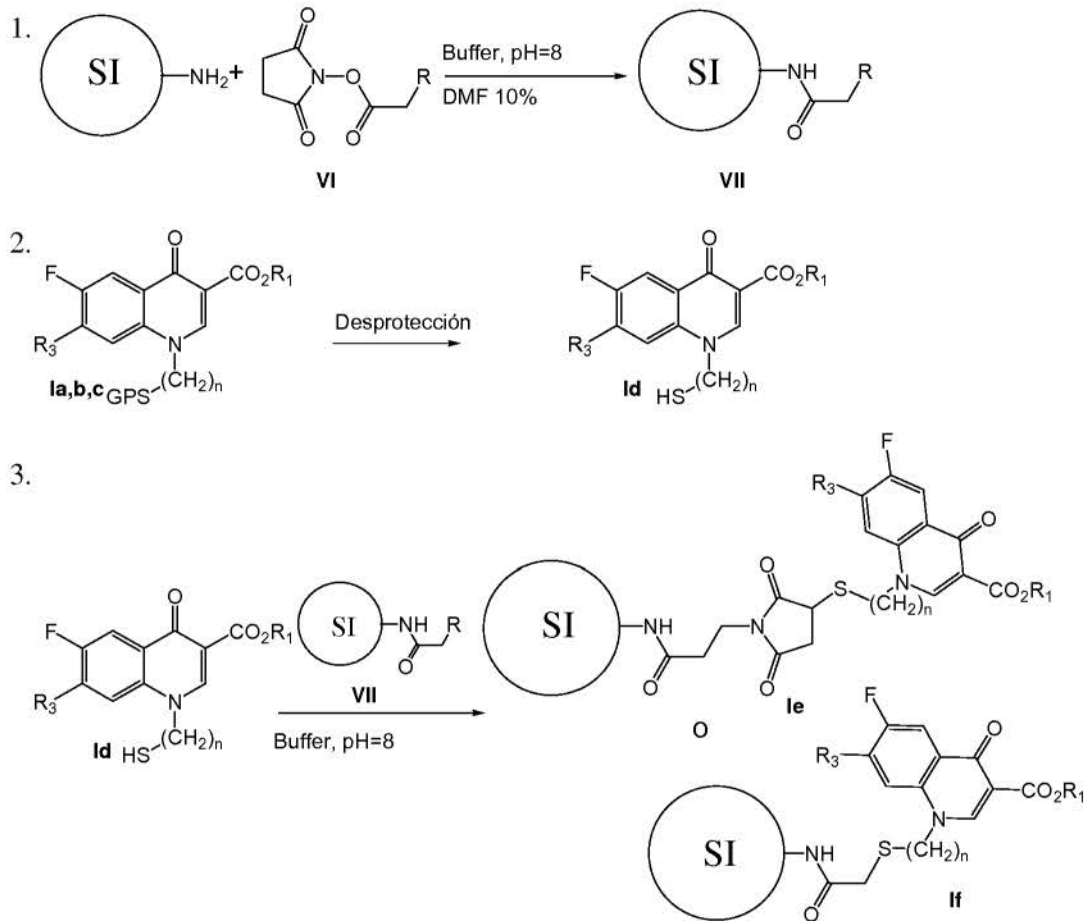
Los haptenos con un grupo tiol se unen covalentemente a los soportes inmunogénicos (SI) activados con grupos susceptibles de reaccionar con dicho grupo tiol (véase esquema 3) mediante compuestos de unión heterobifuncionales.

1. Activación del soporte inmunogénico. Los soportes inmunogénicos se hacen reaccionar con ésteres de succinimido o con cualquier otro éster activo o activador de la reactividad de ácidos carboxílicos que poseen en su estructura funcionalidades reactivas con el grupo tiol.

5 2. Desprotección del grupo tiol. En paralelo, se procede a la desprotección del grupo tiol siguiendo la metodología adecuada para el correspondiente grupo protector.

3. Inmunoconjugación. Se hace reaccionar el hapteno desprotegido con el soporte inmunogénico activado.

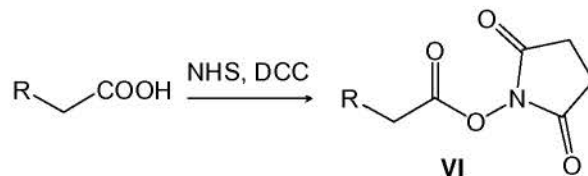
Esquema 3



10 Los agentes activadores de los ácidos carboxílicos están disponibles comercialmente, al igual que los ésteres de succinimido, o se pueden obtener mediante métodos conocidos (March, *Advanced Organic Chemistry*. 1991, Ed. John Wiley & Sons) o utilizando por ejemplos los esquemas descritos a continuación.

El éster de succinimido se puede obtener por reacción del ácido correspondiente con N-hidroxisuccinimida utilizando como activador cualquier carbodiimida, por ejemplo diciclohexilcarbodiimida (véase esquema 4, Hampton *J. Med. Chem.* 1976, 19, 1279-1283).

15 Esquema 4



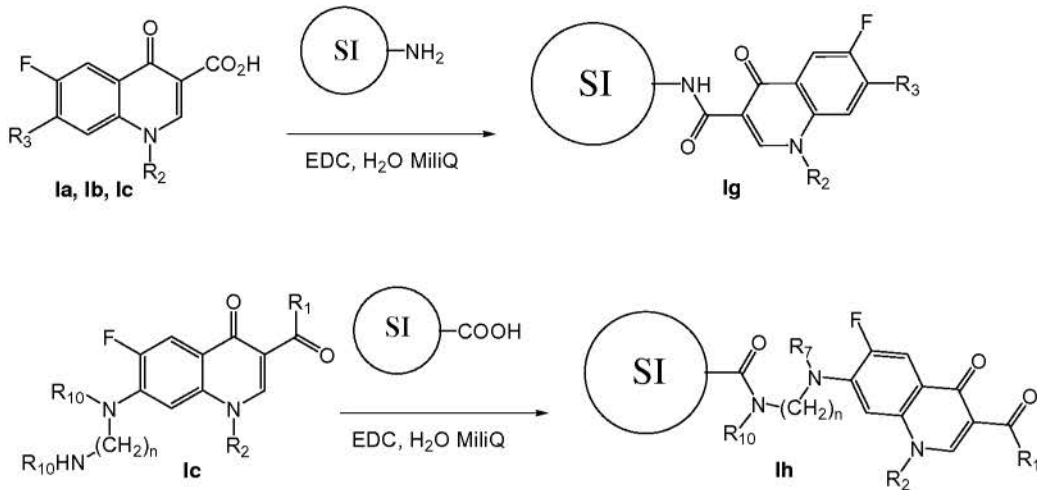
20

b) Haptenos con grupo NH o COOH



En el caso de haptenos con grupos amina y carboxílico se conjugan con los soportes inmunogénicos usando la reacción de la carbodiimida o cualquier otro activador de la reactividad de ácidos carboxílicos, bien procedan del hapteno o del soporte inmunogénico (véase esquema 5).

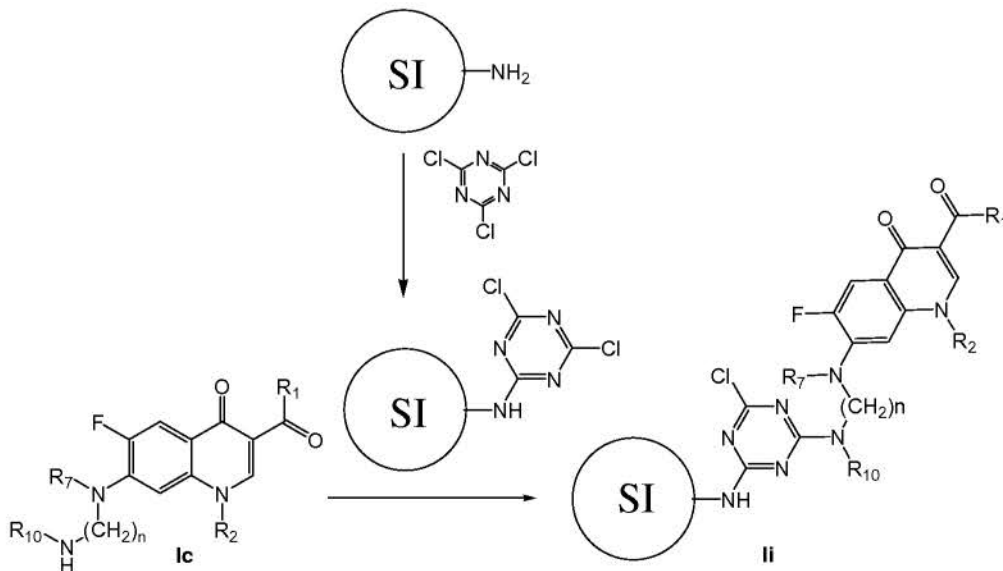
Esquema 5



c) Haptenos con grupos NH<sub>2</sub>

En el caso de haptenos con grupos amina también se conjugan a los soportes inmunogénicos previamente funcionalizados a través de sus grupos amina usando un compuesto de unión homobifuncional. Dichos compuestos de unión homobifuncional pueden ser cloruro cianúrico, bis-Imidoésteres, bis-N-Succinimidil, diisocianatos o diisotiocianatos, dialdehídos, dicetonas o cualquier compuesto susceptible de reaccionar con varios grupos amina por etapas (véase esquema 6).

Esquema 6



A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (I) como haptenos e inmunoreactivos para la obtención de anticuerpos antifluoroquinolonas (FQ) y desarrollo de inmunoensayos para la detección de dichos antibióticos.

**A. QUÍMICA****Procedimientos generales y equipos.**

5 La cromatografía en capa fina se llevó a cabo en láminas de aluminio previamente recubiertas con gel de sílice 60 F254 (Merck, Gibbstown, NJ) y las separaciones de los diferentes compuestos sintetizados, cuando fueron necesarias, se llevaron a cabo mediante cromatografía en columna con sílice 60 A C.C. 35-70  $\mu\text{m}$  SDS. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron con un espectrómetro Mercury-400 de Varian (Varian Inc., Palo Alto, CA) (400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Los reactivos químicos usados en esta síntesis se obtuvieron de ACROS ORGANICS (Geel, Bélgica).

**Preparación de intermedios.**10 Intermedio II

Se calentó una mezcla de la correspondiente 3,4-dihaloanilina (10 mmol) junto con etoximetilenmalonato de dietilo (10 mmol) a 120 °C con agitación. Durante las 2 horas que duró la reacción se pasó una ligera corriente de nitrógeno para eliminar el etanol formado. Posteriormente se secó la mezcla bajo presión reducida obteniéndose el producto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando la correspondiente anilina, se prepararon los siguientes malonatos:

15 2-((3-cloro-4-fluorofenilamino)metilen)malonato de dietilo (**IIa**, 90% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1.32 (3 H, t,  $J=7.14$  Hz), 1.36 (3 H, t,  $J=7.14$  Hz), 4.24 (2 H, q,  $J=7.14$  Hz), 4.29 (2 H, q,  $J=7.14$  Hz), 6.98 (1 H, ddd,  $J=8.97, 3.84, 2.93$  Hz), 7.14 (1 H, t,  $J=8.60$  Hz), 7.18 (1 H, dd,  $J=6.04, 2.93$  Hz), 8.36 (1 H, d,  $J=13.36$  Hz), 10.97 (1 H, d,  $J=13.36$  Hz).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 14.23 (1 C, s) 14.39 (1 C, s) 60.29 (1 C, s) 60.59 (1 C, s) 94.57 (1 C, s) 116.83 (1 C, d,  $J=6.84$  Hz), 117.60 (1 C, d,  $J=22.23$  Hz), 119.19 (1 C, s) 122.33 (1 C, d,  $J=18.81$  Hz), 136.18 (1 C, d,  $J=2.99$  Hz), 151.69 (1 C, s) 155.28 (1 C, d,  $J=247.05$  Hz), 165.42 (1 C, s) 168.91 (1 C, s).

20 2-((3,4-difluorofenilamino)metilen)malonato de dietilo (**IIb**, 90% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1.30 (3 H, t,  $J=7.14$  Hz), 1.35 (3 H, t,  $J=7.14$  Hz), 4.22 (2 H, q,  $J=7.14$  Hz), 4.28 (2 H, q,  $J=7.07$  Hz), 6.78 - 6.87 (1 H, m) 6.96 (1 H, ddd,  $J=11.16, 6.59, 2.74$  Hz), 7.15 (1 H, q,  $J=8.78$  Hz), 8.34 (1 H, d,  $J=13.54$  Hz), 10.96 (1 H, d,  $J=13.36$  Hz).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 14.20 (1 C, s) 14.35 (1 C, s) 60.25 (1 C, s) 60.56 (1 C, s) 94.51 (1 C, s) 106.56 (1 C, d,  $J=20.94$  Hz), 113.01 (1 C, dd,  $J=6.20, 3.63$  Hz), 118.33 (1 C, dd,  $J=18.81, 1.28$  Hz), 136.04 (1 C, dd,  $J=7.69, 2.99$  Hz), 147.47 (1 C, dd,  $J=246.62, 12.82$  Hz), 150.82 (1 C, dd,  $J=250.04, 13.68$  Hz), 151.63 (1 C, s) 165.34 (1 C, s) 168.88 (1 C, s).

25 Intermedio III

30 Se disolvió el correspondiente malonato **II** (9 mmol) en difenil éter (15 mL) y se calentó dicha disolución a reflujo. Después de 2 horas, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadió hexano. Se filtró el sólido resultante, se lavó y se secó para obtener el producto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente malonato, se prepararon los siguientes 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilatos:

35 7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (**IIIa**, 92% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1.32 (3 H, t,  $J=7.14$  Hz), 4.47 (2 H, q,  $J=7.26$  Hz), 8.10 (1 H, d,  $J=2.38$  Hz), 8.12 (1 H, s) 9.11 (1 H, s);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 13.60 (1 C, s) 67.53 (1 C, s) 107.03 (1 C, s) 111.70 (1 C, s) 121.68 (1 C, d,  $J=8.98$  Hz), 124.42 (1 C, s) 137.21 (1 C, d,  $J=21.37$  Hz), 138.00 (1 C, d,  $J=1.28$  Hz), 147.31 (1 C, d,  $J=1.71$  Hz), 160.23 (1 C, d,  $J=260.30$  Hz), 169.04 (1 C, s) 174.53 (1 C, d,  $J=4.27$  Hz).

40 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (**IIIb**, 85% de rendimiento).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1.33 (3 H, t,  $J=7.14$  Hz), 4.49 (2 H, q,  $J=7.07$  Hz), 7.83 (1 H, dd,  $J=8.87, 6.31$  Hz), 8.20 (1 H, t,  $J=8.33$  Hz), 9.14 (1 H, s);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 13.84 (1 C, s) 66.67 (1 C, s) 106.94 (1 C, s) 110.34 (1 C, d,  $J=22.23$  Hz), 113.75 (1 C, dd,  $J=20.94, 2.99$  Hz), 119.30 (1 C, dd,  $J=8.12, 1.28$  Hz), 139.17 (1 C, d,  $J=11.54$  Hz), 147.42 (1 C, d,  $J=0.86$  Hz), 153.97 (1 C, dd,  $J=262.65, 14.75$  Hz), 159.35 (1 C, dd,  $J=270.13, 15.81$  Hz), 169.01 (2 C, s) 174.35 (1 C, d,  $J=4.27$  Hz).

Intermedio IV

45 Se disolvió una mezcla de cloroalquiltiol (15 mmol) y difenilmetanol (15 mmol) en ácido trifluoroacético (30 mL) en un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética a temperatura ambiente. La reacción finalizó después de 2 horas según se observó mediante cromatografía en capa fina (diclorometano como eluyente). Se secó la mezcla a presión reducida. El residuo se disolvió en éter dietílico y se lavó con agua y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de magnesio anhidro, y se evaporaron a sequedad para obtener el compuesto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente cloroalquiltiol, se prepararon los siguientes compuestos:

50 *Bencidril*(3-cloropropil)sulfano (**IVa**, 90% de rendimiento). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1,85 (2 H, dt,  $J=13,36, 6,68$  Hz), 2,43 (2 H, t,  $J=7,04$  Hz), 3,47 (2 H, t,  $J=6,40$  Hz), 4,81 - 5,28 (1 H, m), 7,07 - 7,15 (2 H, m), 7,17 - 7,24 (4 H, m), 7,29 - 7,36 (4

H, m); RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 29,19 (1 C, s), 31,64 (1 C, s), 43,42 (1 C, s), 54,13 (1 C, s), 127,18 (1 C, s), 128,17 (1 C, s), 128,51 (1 C, s), 141,10 (1 C, s).

#### Intermedio V

5 Una mezcla de yoduro de sodio (25 mmol) y **IV** (13 mmol) se disolvió en acetona (25 mL) y se llevó a reflujo en atmósfera inerte y con agitación. Después de 7 horas, se observó mediante RMN  $^1\text{H}$  una conversión total del átomo de cloro. Se secó la mezcla a presión reducida y el residuo se disolvió en *tert*-butil-metil éter y se lavó con agua y disolución saturada de disulfuro de sodio en agua. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad para obtener el producto deseado.

10 Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente cloroalquiltiol protegido, se prepararon los siguientes compuestos:

*Bencidril(3-iodopropil)sulfano (Va, 80% de rendimiento)*. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1,89 (2 H, dt,  $J=13,67, 6,84$  Hz), 2,38 (2 H, t,  $J=6,96$  Hz), 3,12 (2 H, t,  $J=6,84$  Hz), 5,04 (1 H, s), 7,13 (2 H, s,  $J=7,48, 7,48, 1,83, 1,53$  Hz), 7,21 (4 H, t,  $J=7,57$  Hz), 7,30 - 7,33 (4 H, m); RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 5,04 (1 C, s), 32,42 (1 C, s), 32,74 (1 C, s), 54,16 (1 C, s), 127,26 (1 C, s), 128,24 (1 C, s), 128,59 (1 C, s), 141,13 (1 C, s).

#### 15 Intermedio VI

20 Sobre una disolución a 0 °C de *N*-hidroxisuccinimida (12.6 mmol) y dicitclohexilcarbodiimida (20.3 mmol) se añadió el correspondiente ácido (6 mmol) y se dejó reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente. En el caso del compuesto **Vla**, se añadió una disolución de anhídrido maleico (10 mmol) y  $\beta$ -alanina en *N,N*-dimetilformamida a la que previamente se había dejado reaccionar durante 1 hora. Trascorridas las 4 horas de reacción, la mezcla se evaporó a presión reducida y el crudo fue disuelto en diclorometano y lavado con agua. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se evaporaron a sequedad. El residuo fue recrystalizado obteniéndose el compuesto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente ácido, se prepararon los siguientes compuestos:

25 *3-maleimidopropanoato de succinimido (Vla, 25% de rendimiento)*.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 2.82 (4 H, s), 3.02 (2 H, t,  $J=7.07$  Hz), 3.94 (2 H, t,  $J=7.07$  Hz), 6.74 (2 H, s);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 25.5 (2 C, s), 29.7 (1 C, s) 32.9 (1 C, s), 134.3 (2 C, s), 166.0 (1 C, s), 168.7 (2 C, s), 170.1 (2 C, s).

*Iodoacetato de succinimido (Vlb, 30% de rendimiento)*.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 2.87 (2 H, s), 3.96 (1 H, s);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: -12.47 (1 C, s), 25.85 (2 C, s), 164.78 (1 C, s), 168.78 (2 C, s).

#### Preparación de haptenos.

#### 30 Hapteno Ia

35 Se añadió carbonato de potasio anhidro (5 mmol) a una disolución de los correspondientes 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato **III** (2 mmol) y halogenuros de alquilo (sustituídos **V**) (10 mmol), en DMF anhidra (5 mL) y se agitó durante 10 horas a 110°C, en atmósfera inerte. Se evaporó la mezcla a vacío y el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con agua y disolución saturada de disulfuro de sodio en agua. La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$ , y se evaporó hasta sequedad. Cuando fue necesario, se purificó el crudo mediante cromatografía líquida en gel de sílice usando diclorometano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil para obtener el producto deseado.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato, se prepararon los siguientes 1-alkil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilatos:

40 *6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (I1, 80% de rendimiento)*. RMN  $^1\text{H}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 0,97 (3 H, t,  $J=7,32$  Hz), 1,36 (3 H, t,  $J=7,14$  Hz), 1,98 (2 H, td,  $J=15,09, 7,50$  Hz), 4,52 (2 H, q,  $J=7,14$  Hz), 4,61 (2 H, t,  $J=7,69$  Hz), 7,91 (1 H, dd,  $J=10,43, 6,22$  Hz), 8,33 (1 H, t,  $J=8,42$  Hz), 9,18 (1 H, s); RMN  $^{13}\text{C}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 10,56 (1 C, s) 13,93 (1 C, s) 24,00 (1 C, s) 61,39 (1 C, s) 66,81 (1 C, s) 107,02 (1 C, s) 109,01 (1 C, d,  $J=24,36$  Hz), 115,07 (1 C, dd,  $J=20,52, 3,42$  Hz), 120,64 (1 C, d,  $J=8,12$  Hz), 139,67 (1 C, d,  $J=10,69$  Hz), 150,83 (1 C, s) 153,64 (1 C, dd,  $J=263,29, 14,53$  Hz), 159,37 (1 C, dd,  $J=269,70, 15,39$  Hz), 168,67 (1 C, s) 173,38 (1 C, d,  $J=3,85$  Hz).

45 *1-(3-(bencidriltilio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (I2, 80% de rendimiento)*.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $D_6$ )  $\delta$  ppm: 1.27 (3 H, t,  $J=7.14$  Hz), 1.91 (2 H, quin,  $J=7.32$  Hz), 2.37 (2 H, t,  $J=7.23$  Hz), 4.22 (2 H, q,  $J=7.14$  Hz), 4.36 (2 H, t,  $J=6.86$  Hz), 5.31 (1 H, s) 7.17 (2 H, t,  $J=7.32$  Hz), 7.25 (4 H, t,  $J=7.41$  Hz), 7.38 (4 H, d,  $J=7.32$  Hz), 8.00 (1 H, d,  $J=9.51$  Hz), 8.07 (1 H, d,  $J=6.04$  Hz), 8.60 (1 H, s);  $^{13}\text{C}$  RMN (DMSO- $D_6$ )  $\delta$  ppm: 13.68 (1 C, s) 27.24 (1 C, s) 27.58 (1 C, s) 51.33 (1 C, s) 51.94 (1 C, s) 59.31 (1 C, s) 109.05 (1 C, s) 111.89 (1 C, d,  $J=22.23$  Hz), 119.40 (1 C, s) 124.86 (1 C, d,  $J=19.66$  Hz), 126.42 (2 C, s) 127.25 (4 C, s) 127.82 (4 C, s) 128.03 (1 C, d,  $J=5.56$  Hz), 135.13 (1 C, d,  $J=1.28$  Hz), 140.85 (2 C, s) 149.29 (1 C, s) 153.74 (1 C, d,  $J=247.48$  Hz), 163.60 (1 C, s) 170.71 (1 C, d,  $J=2.14$  Hz).

5 *1-(3-(bencidriltilio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (I3, 75% de rendimiento)*.  $^1\text{H}$  RMN (TFAd)  $\delta$  ppm: 1.36 (3 H, t, J=7.23 Hz), 2.09 (2 H, quin, J=7.14 Hz), 2.48 (2 H, t, J=6.50 Hz), 4.52 (2 H, q, J=7.14 Hz), 4.69 (2 H, t, J=7.04 Hz), 4.97 (1 H, s), 7.04 - 7.09 (2 H, m), 7.12 (4 H, t, J=7.23 Hz), 7.20 (4 H, d, J=7.14 Hz), 7.90 (1 H, dd, J=10.15, 6.13 Hz), 8.31 (1 H, t, J=8.45 Hz), 9.22 (1 H, s);  $^{13}\text{C}$  RMN (TFAd)  $\delta$  ppm: 13.93 (1 C, s), 28.58 (1 C, s), 29.83 (1 C, s), 56.63 (1 C, s), 58.38 (1 C, s), 66.76 (1 C, s), 106.86 (1 C, s), 109.00 (1 C, d, J=23.51 Hz), 115.07 (1 C, dd, J=20.52, 2.99 Hz), 120.48 (1 C, d, J=6.84 Hz), 128.26 (2 C, s), 129.27 (4 C, s), 130.10 (4 C, s), 139.44 (1 C, d, J=9.83 Hz), 141.79 (2 C, s), 151.39 (1 C, s), 153.55 (1 C, dd, J=263.29, 14.53 Hz), 159.26 (1 C, dd, J=269.70, 15.39 Hz), 168.54 (1 C, s), 173.39 (1 C, d, J=4.28 Hz).

#### Hapteno Ib

10 Se mantuvo a reflujo una disolución del 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato correspondiente **III** o **la** (1 mmol) e hidróxido de potasio (2,5 mmol) en una mezcla de THF:agua (3:1, 4 mL) con agitación durante 4,5 horas. Se vertió el crudo de reacción sobre una mezcla de hielo-agua (50 mL), acidificada con HCl 1M, se filtró el precipitado resultante y se lavó con agua fría para obtener los correspondientes ácidos carboxílicos.

Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente carboxilato, se prepararon los siguientes ácidos carboxílicos:

15 *Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I4, 80% de rendimiento)*. RMN  $^1\text{H}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 7,86 (1 H, dd, J=8,87, 6,31 Hz), 8,24 (1 H, t, J=8,33 Hz), 9,23 (1 H, s); RMN  $^{13}\text{C}$  (TFAd)  $\delta$  ppm 106,10 (1 C, s), 110,46 (1 C, dd, J=22,44, 1,07 Hz), 113,91 (1 C, dd, J=20,52, 2,99 Hz), 119,29 (1 C, dd, J=7,91, 1,50 Hz), 139,38 (1 C, d, J=11,54 Hz), 148,16 (1 C, d, J=1,71 Hz), 154,06 (1 C, dd, J=263,29, 14,53 Hz), 159,55 (1 C, dd, J=270,99, 15,81 Hz), 171,52 (1 C, s), 174,56 (1 C, d, J=4,27 Hz).

20 *Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I5, 95% de rendimiento)*, RMN  $^1\text{H}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 0,94 (4 H, t, J=7,41 Hz), 1,96 (2 H, td, J=15,00, 7,50 Hz), 4,60 (2 H, t, J=7,69 Hz), 7,90 (1 H, dd, J=10,34, 6,13 Hz), 8,31 (1 H, t, J=8,42 Hz), 9,24 (1 H, s); RMN  $^{13}\text{C}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 10,59 (1 C, s), 24,00 (1 C, s), 61,52 (1 C, s), 106,32 (1 C, s), 109,16 (1 C, d, J=23,51 Hz), 115,27 (1 C, dd, J=20,52, 2,99 Hz), 120,69 (1 C, d, J=7,27 Hz), 139,95 (1 C, d, J=9,83 Hz), 151,65 (1 C, s), 153,74 (1 C, dd, J=263,93, 14,32 Hz), 159,56 (1 C, dd, J=270,13, 15,39 Hz), 171,09 (1 C, s), 173,67 (1 C, d, J=3,85 Hz).

30 *Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I6, 85% de rendimiento)*, RMN  $^1\text{H}$  (DMSO-d6)  $\delta$  ppm: 1,96 (2 H, dt, J=14,41, 7,16 Hz), 2,36 (2 H, t, J=7,44 Hz), 4,49 (2 H, t, J=6,86 Hz), 5,29 (1 H, s), 7,17 (1 H, t, J=7,23 Hz), 7,24 (4 H, t, J=7,41 Hz), 7,36 (4 H, d, J=7,14 Hz), 8,15 (1 H, dd, J=12,26, 6,59 Hz), 8,23 (1 H, dd, J=10,34, 8,87 Hz), 8,90 (1 H, s); RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO-D6)  $\delta$  ppm: 27,33 (1 C, s), 27,45 (1 C, s), 51,76 (1 C, s), 52,25 (1 C, s), 106,99 (1 C, d, J=22,65 Hz), 108,54 (48 C, s), 112,79 (1 C, d, J=18,38 Hz), 122,75 (1 C, d, J=4,27 Hz), 126,39 (2 C, s), 127,25 (4 C, s), 127,82 (4 C, s), 136,13 (1 C, d, J=10,26 Hz), 140,78 (1 C, s), 147,41 (1 C, dd, J=249,83, 14,32 Hz), 148,99 - 149,42 (1 C, m), 152,65 (1 C, dd, J=253,89, 14,96 Hz), 164,98 (1 C, s), 175,47 (1 C, d, J=1,71 Hz).

#### Hapteno Ic1

35 Se calentó una disolución de la 4-oxo-1,4-dihidroquinolina **la** o **lb** (0,75 mmol) y la amina correspondiente (1,9 mmol) en DMSO anhidro (2 mL) a 110°C en atmósfera inerte. Después de 5 horas, se eliminó el disolvente a vacío elevado y el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. Finalmente, la fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$ , y se evaporó hasta sequedad.

Usando dicha metodología, utilizando la correspondiente 4-oxo-1,4-dihidroquinolina, se prepararon las siguientes 7-amino-4-oxo-1,4-dihidroquinolinas:

40 *Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I7, 60% de rendimiento)*. RMN  $^1\text{H}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 3,54 - 3,63 (4 H, m), 4,03 - 4,11 (4 H, m), 7,36 (1 H, d, J=6,95 Hz), 8,04 (1 H, d, J=12,81 Hz), 9,08 (1 H, s); RMN  $^{13}\text{C}$  (TFAd)  $\delta$  ppm 50,96 (2 C, d, J=6,41 Hz), 67,74 (2 C, s), 104,42 (1 C, s), 107,21 (1 C, d, J=4,27 Hz), 112,24 (1 C, d, J=26,07 Hz), 115,74 (1 C, d, J=10,26 Hz), 139,34 - 141,64 (1 C, s), 146,83 (1 C, s), 150,38 (1 C, d, J=10,69 Hz), 157,04 (1 C, d, J=259,02 Hz), 172,37 (1 C, s), 172,66 (1 C, d, J=4,70 Hz).

45 *Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I8, 70% de rendimiento)*. RMN  $^1\text{H}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 0,94 (3 H, t, J=7,41 Hz), 1,97 (2 H, td, J=14,68, 7,23 Hz), 3,54 - 3,59 (4 H, m), 4,01 - 4,07 (4 H, m), 4,56 (2 H, t, J=7,32 Hz), 7,19 (1 H, d, J=6,77 Hz), 8,07 (1 H, d, J=12,81 Hz), 9,04 (1 H, s); RMN  $^{13}\text{C}$  (TFAd)  $\delta$  ppm 10,74 (1 C, s), 23,47 (1 C, s), 51,03 (2 C, d, J=6,41 Hz), 60,72 (2 C, s), 67,90 (1 C, s), 104,56 (1 C, s), 105,60 (1 C, d, J=3,85 Hz), 113,43 (1 C, d, J=25,64 Hz), 116,94 (1 C, d, J=9,83 Hz), 141,08 (1 C, s), 150,32 (1 C, s), 150,60 (1 C, d, J=10,26 Hz), 156,84 (1 C, d, J=259,02 Hz), 171,77 (1 C, d, J=4,27 Hz), 171,97 (1 C, s).

55 *Ácido 7-(2-aminoetilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I9, 60% de rendimiento)*. RMN  $^1\text{H}$  (TFAd)  $\delta$  ppm: 0,89 (3 H, t, J=7,32 Hz), 1,91 (2 H, dt, J=7,14 Hz), 3,54 (2 H, s), 3,82 (2 H, t, J=6,86 Hz), 6,87 (1 H, d, J=6,22 Hz), 7,96 (1 H, d, J=10,61 Hz), 8,93 (1 H, s); RMN  $^{13}\text{C}$  (TFAd)  $\delta$  ppm 10,64 (1 C, s), 23,18 (1 C, s), 40,87 (1 C, s), 41,37 (1 C, s), 60,49 (1 C, s), 97,13 (1 C, d, J=3,85 Hz), 103,93 (1 C, s), 111,04 (1 C, d, J=23,08 Hz), 114,40 (1 C, d, J=9,40 Hz), 142,16 (1 C, s), 147,83 (1 C, d, J=14,11 Hz), 149,72 (1 C, s), 153,83 (1 C, d, J=256,03 Hz), 171,12 (1 C, d, J=4,27 Hz), 172,20 (1 C, s).



5 *Ácido 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I10, 90% de rendimiento en un recipiente presurizado). RMN <sup>1</sup>H (TFAd) δ ppm: 0,91 (3 H, t, J=7,41 Hz), 1,16 (6 H, t, J=7,23 Hz), 1,93 (2 H, td, J=14,59, 7,23 Hz), 3,88 (4 H, q, J=7,14 Hz), 4,68 (2 H, t, J=7,23 Hz), 8,48 (1 H, d, J=10,43 Hz), 8,53 (1 H, d, J=4,57 Hz), 9,31 (1 H, s); RMN <sup>13</sup>C (TFAd) δ ppm 10,77 (1 C, s) 11,16 (2 C, s) 24,25 (1 C, s) 56,80 (2 C, s) 61,38 (1 C, s) 108,12 (1 C, s) 113,86 (1 C, d, J=66,25 Hz), 118,07 (1 C, d, J=6,84 Hz), 139,07 (1 C, s) 151,91 (1 C, d, J=48,73 Hz), 153,17 - 153,70 (1 C, m) 156,33 (1 C, d, J=259,87 Hz), 170,66 (1 C, s) 174,56 (1 C, s).*

10 *Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I11, 70% de rendimiento), RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d6) δ ppm: 2,02 (2 H, dt, J=13,77, 6,93 Hz), 2,34 (2 H, t, J=6,95 Hz), 3,25 (4 H, s) 3,73 (4 H, s) 4,56 (2 H, t, J=6,31 Hz), 5,32 (1 H, s) 7,10 (1 H, d, J=6,95 Hz), 7,18 (2 H, t, J=7,14 Hz), 7,25 (4 H, t, J=7,50 Hz), 7,37 (4 H, d, J=7,32 Hz), 7,90 (1 H, d, J=13,36 Hz), 20,00 (1 H, s); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d6) δ ppm 27,20 (1 C, s) 27,47 (1 C, s) 49,13 (2 C, d, J=4,70 Hz), 51,72 (1 C, s) 51,88 (1 C, s) 65,19 (2 C, s) 105,16 (1 C, s) 106,30 (1 C, s) 110,60 (1 C, d, J=22,65 Hz), 118,78 (1 C, d, J=7,69 Hz), 126,42 (2 C, s) 127,23 (4 C, s) 127,83 (4 C, s) 136,58 (1 C, s) 140,77 (1 C, s) 144,70 (1 C, d, J=9,83 Hz), 148,33 (1 C, s) 152,23 (1 C, d, J=249,62 Hz), 165,41 (1 C, s) 175,55 (1 C, d, J=2,56 Hz).*

15 *Ácido 1-(3-(bencidriltilio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperaciniil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I12, 95% de rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (TFAd) δ ppm: 2.17 (2 H, m) 2.49 (2 H, t, J=6.96 Hz), 3.35 (4 H, s) 3.72 (4 H, s) 4.75 (2 H, t, J=6.68 Hz), 5.08 (1 H, s) 7.11 (2 H, t, J=7.14 Hz), 7.18 (4 H, t, J=7.32 Hz), 7.28 (4 H, d, J=7.32 Hz), 7.51 (1 H, d, J=6.22 Hz), 8.13 (1 H, d, J=12.44 Hz), 9.13 (1 H, s); <sup>13</sup>C RMN (TFAd) δ ppm: 29.31 (1 C, s) 29.58 (1 C, s) 45.68 (2 C, s) 47.87 (2 C, d, J=6.41 Hz), 56.90 (1 C, s) 57.22 (1 C, s) 104.92 (1 C, s) 106.66 (1 C, s) 113.60 (1 C, d, J=25.65 Hz), 117.92 (1 C, d, J=8.98 Hz), 128.22 (2 C, s) 129.34 (4 C, s) 130.19 (4 C, s) 140.67 (1 C, s) 141.80 (2 C, s) 149.66 (1 C, d, J=10.69 Hz), 150.88 (1 C, s) 156.48 (1 C, d, J=259.02 Hz), 171.58 (1 C, s) 172.04 (1 C, d, J=3.85 Hz).*

#### 20 Hapteno Ic2

Se agitó una disolución de la piperaciniil fluoroquinolona correspondiente **Ic1** (0,5 mmol) y formaldehído (2 mmol) en ácido fórmico (1 mL) a 110°C durante 2,5 horas y se evaporó la mezcla hasta sequedad.

25 Usando dicha metodología, utilizando el correspondiente piperaciniil fluoroquinolona, se preparo la siguiente metilpiperaciniil fluoroquinolona:

30 *Ácido 6-fluoro-7-(4-metilpiperaciniil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I13, Rendimiento cuantitativo), RMN <sup>1</sup>H (TFAd) δ ppm: 0,89 (3 H, t, J=7,32 Hz), 1,92 (1 H, td, J=14,45, 7,14 Hz), 2,97 (3 H, s) 3,31 (2 H, t, J=11,16 Hz), 3,48 (2 H, t, J=12,90 Hz), 3,69 (2 H, d, J=12,26 Hz), 3,99 (2 H, d, J=13,91 Hz), 4,55 (2 H, t, J=7,32 Hz), 7,24 (1 H, d, J=6,40 Hz), 8,09 (1 H, d, J=12,26 Hz), 9,05 (1 H, s); RMN <sup>13</sup>C (TFAd) δ ppm: 10,71 (1 C, s) 23,57 (1 C, s) 45,28 (2 C, s) 47,94 - 48,53 (2 C, m, J=5,98 Hz), 55,83 (1 C, s) 60,84 (1 C, s) 105,07 (1 C, s) 107,06 (1 C, d, J=2,99 Hz), 113,66 (1 C, d, J=25,65 Hz), 118,04 (1 C, d, J=10,26 Hz), 140,81 (1 C, s) 149,51 (1 C, d, J=10,68 Hz), 150,61 (1 C, s) 156,86 (1 C, d, J=258,16 Hz), 171,77 (1 C, s) 172,28 (1 C, d, J=3,85 Hz).*

## B. INMUNOQUÍMICA

### 35 Procedimientos generales y equipos.

La desprotección del grupo tiol de los haptenos correspondientes se monitorizó mediante HPLC-UV, usando una bomba Merck Hitachi I-7100 provista de un detector L-7455 de matriz de diodos, un automuestreador L-7200, y una interfaz D7000 (Merck, Darmstadt, Alemania). Los cromatogramas se procesaron con el software HSM (Merck, Darmstadt, Alemania). Se utilizó una columna Lichrospher 100 RP-18 125x4 (5mm; Merck, Darmstadt, Alemania) y los análisis se llevaron a cabo en modo gradiente usando acetonitrilo (ACN): tampón citrato (50 mM, pH=3) como fase móvil a un caudal de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Las reacciones se monitorizaron a dos longitudes de onda: 330 nm y 280 nm. El MALDI-TOF-MS (espectrómetro de masas con detección por tiempo de vuelo, con ionización por desorción mediante láser asistida por matriz) usado para analizar los conjugados de proteína fue una Estación de Trabajo Perspective BioSpectrometry provista del software Voyager-DE-RP (versión 4.03) desarrollado por Perspective Biosystems Inc. (Framingham, MA) y Grams/386 (para Microsoft Windows, versión 3.04, nivel III) desarrollado por Galactic Industries Corporation (Salem, NH).

### Análisis de la densidad del hapteno.

50 Las densidades del hapteno de los conjugados de proteína se calcularon mediante MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de las proteínas naturales con el de los conjugados. Los experimentos de MALDI se realizaron mezclando 2 μL de la matriz recientemente preparada (ácido *trans*-3,5-dimetoxi-4-hidroxycinnámico, 10 mg mL<sup>-1</sup> en ACN/H<sub>2</sub>O 70:30, TFA al 0,1%) con 2 μL de una disolución de los conjugados o las proteínas en ACN/H<sub>2</sub>O 70:30, TFA al 0,1% (5 mg mL<sup>-1</sup>). Se calculó la densidad del hapteno (δ<sub>Hapteno</sub>) según la siguiente ecuación: [PM(Conjugado)-PM(Proteína)] / PM(Hapteno).

55 El pH y la conductividad de todos los tampones y disoluciones se midieron con un pH metro pH 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Las placas de microvaloración de poliestireno se adquirieron de Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Las etapas de lavado del ELISA se llevaron a cabo en un lavador de

microplacas SLY96 PW (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Las absorbancias se leyeron en un SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las curvas de competencia se analizaron con una ecuación logística de cuatro parámetros usando el software SoftmaxPro v2.6 (Molecular Devices) y GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## 5 **Productos químicos e inmunológicos.**

Se obtuvieron los productos inmunológicos de Sigma Chemical Co. (San. Luis, MO). Los productos químicos usados para los estudios de reactividad cruzada se adquirieron de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

### **Tampones.**

10 Disolución salina tamponada con fosfato (PBS) es tampón fosfato 0,01 M en una disolución salina al 0,8%, y el pH es 7,5. PBST es PBS con Tween 20 al 0,05%. Tampón borato es ácido bórico/borato de sodio 0,2 M pH=8.7. Tampón de tapizado es tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Tampón citrato es una disolución 0,04 M de citrato de sodio, pH 5.5. La disolución del sustrato contiene TMB al 0,01% (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,004% en tampón citrato.

### **Preparación de inmunoreactivos.**

## 15 **Inmunoreactivo le e lf**

La haptización de los soportes inmunogénicos en el caso de haptenos que poseen un grupo tiol se realizó mediante una secuencia de tres etapas que se describen a continuación.

20 **Etapas 1: Activación de las proteínas (VII).** Se añadió gota a gota una disolución del correspondiente éster de succinimido VI (70 µmol) en DMF anhidra (400 µL) a una disolución de la proteína (15 mg) en tampón borato y se ajustó el pH a 8 mediante trietilamina. Se mantuvo la mezcla a 4°C durante la noche y se purificó la proteína activada mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Sephadex G-25 Superfine desaladora HiTrap de 5 mL (Amersham Biosciences) y tampón borato como eluyente. Se recogieron las fracciones eluidas (0.5 mL) de las proteínas así activadas, y se combinaron las de resultado positivo en el ensayo de la proteína de Bradford (3 mL) (Bradford, M. M. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, 248-254). Se reservó una parte de esta disolución para el análisis MALDI-TOF-MS y se usó el resto para la conjugación según se describe en la etapa 3.

De esta manera, utilizando el correspondiente éster de succinimido, se prepararon las siguientes proteínas activadas:

*3-maleimidopropanoato de BSA (VIIa).* δ<sub>Hapteno</sub> (mol Hapteno/mol proteína): 31.29.

*Iodoacetato de BSA (VIIb).* δ<sub>Hapteno</sub> (mol Hapteno/mol proteína): 15.62.

30 **Etapas 2. Desprotección (Id).** Se disolvió el hapteno con grupo tiol protegido **la,b,c** (0,18 mmol) y anisol (2,74 mmol) en ácido trifluoroacético (2 mL) y se agitó la mezcla resultante a 45°C durante 1,5 h hasta que se observó una conversión total del producto de partida mediante HPLC-UV. En este momento, se evaporó el disolvente hasta sequedad a vacío y el residuo se disolvió en agua y se lavó con diclorometano. Se usó inmediatamente la capa acuosa para la conjugación sin purificación adicional según se describe en la etapa 3.

De esta manera se obtuvieron los correspondientes haptenos con el grupo tiol libre:

35 **Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I14,** 68% de rendimiento) RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1.60 (1 H, t, J=8.06 Hz), 2.21 (2 H, tt, J=7.08, 6.84 Hz), 2.69 (2 H, q, J=7.57, 6.84, 5.86 Hz), 3.32 (4 H, t, J=4.64 Hz), 3.91 (4 H, t, J=4.64 Hz), 4.44 (2 H, t, J=7.57 Hz), 7.01 (1 H, d, J=6.84 Hz), 8.07 (1 H, d, J=13.18 Hz), 8.69 (1 H, s); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 21.43 (1 C, s) 32.39 (1 C, s) 50.51 (2 C, s) 52.80 (1 C, s) 66.80 (2 C, s) 104.05 (1 C, s) 108.70 (1 C, s) 113.28 (1 C, d, J=26.55 Hz), 121.01 (1 C, s) 137.52 (1 C, s) 146.34 (1 C, d, J=10.98 Hz), 148.03 (1 C, s) 153.77 (1 C, d, J=253.12 Hz), 167.42 (1 C, d, J=0.91 Hz), 177.28 (1 C, d, J=2.29 Hz).

40 **Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacínil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I15,** 45% de rendimiento) RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ ppm: 1H 2.54 (2 H, s) 2.87 - 3.00 (2 H, m) 3.78 - 4.06 (4 H, m) 4.07 - 4.22 (4 H, m) 4.92 - 5.33 (2 H, m) 7.86 (1 H, d, J=6.35 Hz), 8.46 (1 H, d, J=12.21 Hz), 9.51 (1 H, s); <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O) δ ppm: 21.49 (1 C, s), 32.87 (1 C, s), 44.17 (2 C, s), 47.44 (2 C, d, J=5.17 Hz), 54.18 (1 C, s), 106.69 (1 C, s), 106.82 (1 C, s), 111.85 (1 C, d, J=23.92 Hz), 120.02 (1 C, d, J=8.41 Hz), 138.05 (1 C, s), 145.78 (1 C, d, J=10.34 Hz), 149.32 (1 C, s), 153.99 (1 C, d, J=251.52 Hz), 169.54 (1 C, s), 176.35 (1 C, d, J=1.94 Hz).

45 **Etapas 3 Bioconjugación (le, lf).** Se añadió gota a gota la fase acuosa del hapteno con el grupo tiol desprotegido de la etapa 2 **Id**, sobre la disolución de proteína activada purificada de la etapa 1 **VII**. Se ajustó el pH a 8 utilizando trietilamina. Se mantuvo la mezcla con agitación suave durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se purificaron los inmunoreactivos mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 L) y agua milliQ (1 x 5 L) y se liofilizaron.

Utilizando dicha metodología se prepararon los siguientes inmunoreactivos:



Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I16).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 2.23.

Ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(carboxamida de BSA)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacínil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico. (I17).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 12.46.

5 Ácido 1-[3-(2-acetamida de HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacínil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I18).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína) (UV cuantitativo): 14.37

Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacínil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I19).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 14.15.

### **Inmunoreactivo Iq e lh**

10 La haptenización de los soportes inmunogénicos para el caso de haptenos que poseen un grupo ácido o amina se realizó de la siguiente manera.

Se añadió una disolución del hapteno **Ib,c** (10  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (100  $\mu\text{L}$ ) a una disolución de la proteína (10 mg) en agua milliQ (1 mL) seguido por la adición de una disolución de EDC (50  $\mu\text{mol}$ ) en agua milliQ (100  $\mu\text{L}$ ) y se agitó la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente. Se purificaron los conjugados de las proteínas mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 l) y agua milliQ (1 x 5 l) y se liofilizaron.

15 Utilizando dicha metodología se prepararon los siguientes inmunoreactivos:

6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I20). MS  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 7.11.

6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (I21).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 2.60.

6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I22).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 3.74.

20 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (I23).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 1.09.

6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I24).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 1.37.

6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I25).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 1.79.

25 Ácido 7-[2-(acetamida de BSA)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico BSA (I26).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 5.28.

7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I27).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 4.62.

30 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (I28).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 4.30.

6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA (I29).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 2.16.

6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA (I30).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 1.36.

35 **Inmunoreactivo li**

La haptenización de los soportes inmunogénicos en el caso de haptenos que poseen un grupo amino también se realizó mediante una reacción en dos etapas que se describen a continuación.

40 Se añadió una disolución de cloruro cianúrico (1,5  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (150  $\mu\text{L}$ ) a una disolución de la proteína (6 mg) en tampón carbonato a pH 9.6 (1 mL). Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas, tras las cuales se añadió gota a gota una disolución del correspondiente hapteno **Ic** (2  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (60  $\mu\text{L}$ ). Se mantuvo la mezcla con agitación suave durante 4 horas a 37 °C. Finalmente, se purificaron los inmunoreactivos mediante diálisis frente a PBS 0,5 mM (4 x 5 L) y agua milliQ (1 x 5 L) y se liofilizaron.

Utilizando dicha metodología se prepararon los siguientes inmunoreactivos:

45 Ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5,-triazin-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (I31).  $\delta_{\text{Hapteno}}$  (mol Hapteno/mol proteína): 1.76.

**Preparación de antisueros policlonales.**

Se llevó a cabo el protocolo de inmunización en hembras de conejos blancos New Zealand que pesaban 1-2 kg, según se ha descrito anteriormente (Salvador, *Analytical Chemistry*. 2007, 79, 3734-3740). Los inmunógenos (100 µg) disueltos en PBS (0.5 mL) fueron emulsionados con adyuvante de Freund, completo la primera vez e incompleto el resto, en una relación 1:1. Inmediatamente fueron inyectados de manera intradérmica en diferentes lugares de la espalda del animal huésped (una inyección al mes). Se evaluó la evolución de los títulos del anticuerpo midiendo la unión de las diluciones en serie de los diferentes antisueros en placas de microvaloración recubiertas con el correspondiente inmunoreactivo. Después de observarse un título aceptable de anticuerpos, se desangraron los animales y se recogió la sangre en tubos vacutainer provistos de un gel de separación del suero. Se obtuvieron los antisueros mediante centrifugación y se almacenaron a -80 °C en presencia de NaN<sub>3</sub> al 0,02%.

**Desarrollo de ELISAs competitivos indirectos para quinolonas**

Las placas de microvaloración se recubrieron con el correspondiente antígeno de tapizado (formato indirecto) o antisuero (formato directo) disuelto en tampón de de tapizado (100 µL/pocillo) durante toda la noche a 4°C o 4 horas a temperatura ambiente y se cubrieron con placas adhesivas herméticas. Posteriormente, se lavaron las placas con PBST (cuatro veces, 300 µL/pocillo) y se añadieron los patrones de quinolona (0.01 nM - 10000 nM, en PBST, 50 µL/pocillo) seguidos por el correspondiente antisuero (formato indirecto) o trazador enzimático (formato directo) (50 µL/pocillo) a las placas de microvaloración. Después de 30 min a temperatura ambiente, se lavaron las placas como se ha descrito anteriormente y para el caso del formato indirecto se añadió una disolución de IgG antiIgG de conejo marcada con HRP (1/6000 en PBST) (100 µL/pocillo) y se incubaron durante 30 min más a temperatura ambiente. Se lavaron las placas de nuevo, y para ambos formatos se añadió la disolución del sustrato (100 µL/pocillo). Se detuvo el desarrollo del color después de 30 min a temperatura ambiente con 4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N (50 µL/pocillo), y se leyó la absorbancia a 450 nm. Las curvas patrón se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros según la siguiente fórmula:  $Y = [(A - B)/1 - (x/C)D] + B$ , en la que *A* es la absorbancia máxima, *B* es la absorbancia mínima, *C* es la concentración que produce el 50% de la absorbancia máxima, y *D* es la tangente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea.

De esta manera se obtuvieron los siguientes ELISAs competitivos para ciprofloxacino:

| As  | IR  | [IR]<br>µg/mL | [As]<br>Dilución | Abs max | Abs min | IC50<br>µg/L | Pendiente | R <sup>2</sup> |
|-----|-----|---------------|------------------|---------|---------|--------------|-----------|----------------|
| 171 | I16 | 2.5           | 1/16000          | 1.767   | 0.137   | 16.40        | -0.857    | 0.9980         |
| 171 | I19 | 0.0156        | 1/128000         | 1.615   | 0.073   | 4.81         | -0.661    | 0.9985         |
| 171 | I26 | 0.25          | 1/16000          | 1.360   | 0.098   | 1.66         | -0.793    | 0.9691         |
| 172 | I16 | 2.5           | 1/4000           | 1.900   | 0.090   | 38.39        | -0.770    | 0.9959         |
| 172 | I19 | 0.0156        | 1/32000          | 1.817   | 0.088   | 27.60        | -0.646    | 0.9928         |
| 172 | I26 | 0.25          | 1/4000           | 1.427   | 0.079   | 11.56        | -0.845    | 0.9939         |
| 173 | I16 | 5             | 1/16000          | 1.748   | 0.144   | 134.68       | -0.538    | 0.9959         |
| 173 | I19 | 0.0156        | 1/128000         | 1.710   | 0.165   | 48.55        | -0.547    | 0.9939         |
| 173 | I26 | 0.25          | 1/16000          | 0.915   | 0.013   | 1.49         | -0.253    | 0.9825         |
| 171 | I31 | 0.0625        | 1/8000           | 1.49    | 0.032   | 0.81         | -1.46     | 0.9952         |

**Tabla 1:** Parámetros de ensayos ELISA competitivo para la detección de ciprofloxacino utilizando inmunoreactivos y anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

**Determinaciones de la reactividad cruzada.**

Se prepararon disoluciones madre a una concentración de 10 mM para diferentes quinolonas y otros antibióticos en hidróxido de sodio (50 mM) y se midieron por ELISA. Se calcularon los valores de la reactividad cruzada según la ecuación:  $(DI_{50} \text{ CPFX}/DI_{50} \text{ de los compuestos ensayados}) \times 100$ .

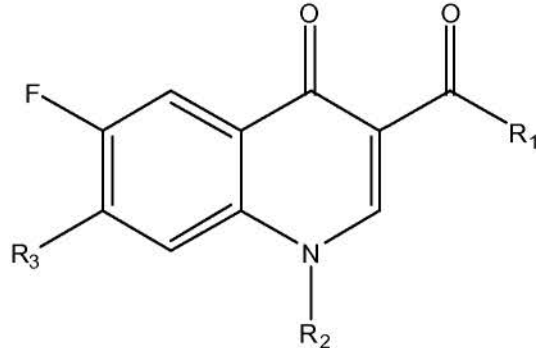
En la siguiente tabla se muestran los valores de IC<sub>50</sub> y reactividad cruzada utilizando los inmunoreactivos y anticuerpos desarrollados en esta invención.

| Compuesto       | IC <sub>50</sub> (µg·L <sup>-1</sup> ) | % CR |
|-----------------|--|------|
| Ciprofloxacino  | 0.77 ± 0.27                            | 100  |
| Enrofloxacin    | 0.65                                   | 95   |
| Danofloxacin    | 7.31                                   | 8    |
| Difloxacin      | 0.91                                   | 75   |
| Marbofloxacino  | 4,30                                   | 28   |
| Flumequina      | 3.91                                   | 22   |
| Ácido Oxolínico | 23,53                                  | 4    |
| Norfloxacin     | 0.78                                   | 81   |
| Sarafloxacin    | 0.96                                   | 80   |
| Ofloxacin       | 1.84                                   | 39   |
| Sulfametazina   | >1000                                  | <0.2 |
| Sulfatiazol     | >1000                                  | <0.2 |
| Cloramfenicol   | >1000                                  | <0.2 |
| Tetraciclina    | >1000                                  | <0.2 |
| Doxiciclina     | >1000                                  | <0.2 |
| Ampicillina     | >1000                                  | <0.2 |

**Tabla 2:** Datos de IC<sub>50</sub> y reactividad cruzada para distintos antibióticos utilizando anticuerpos desarrollados con los inmunoreactivos descritos en la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



(I)

o sus sales, isómeros o solvatos,

5 donde

R<sub>1</sub> se selecciona entre OH, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, OR<sub>4</sub>, NHR<sub>4</sub>, donde R<sub>4</sub> es un soporte inmunogénico;

R<sub>2</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, donde m es un valor de 3 a 6 cuando R<sub>5</sub> se selecciona entre O ó NH o m es un valor de 1 a 6 cuando R<sub>5</sub> es S y R<sub>6</sub> se selecciona entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, alquil-arilo, R<sub>4</sub> o LR<sub>4</sub> donde L es un compuesto de unión bifuncional;

10 R<sub>3</sub> se selecciona entre, heterociclo, halógeno o NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, donde R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub> se seleccionan independientemente entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, donde n es un valor de 1 a 6, R<sub>9</sub> se selecciona entre S, O ó NH y R<sub>10</sub> se selecciona entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, alquil-arilo, R<sub>4</sub> o LR<sub>4</sub>.

2. Compuesto según la reivindicación 1 donde R<sub>1</sub> es O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

3. Compuesto según la reivindicación 2 donde R<sub>1</sub> es O-etilo.

15 4. Compuesto según la reivindicación 1 donde R<sub>1</sub> es OH.

5. Compuesto según la reivindicación 1 donde R<sub>1</sub> es NHR<sub>4</sub> siendo R<sub>4</sub> es proteína que se selecciona entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura.

20 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde R<sub>2</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-R<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, donde R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> se definen como en la reivindicación 1.

7. Compuesto según la reivindicación 6 donde R<sub>5</sub> es S y R<sub>6</sub> se selecciona entre H o LR<sub>4</sub>, siendo L maleimidopropanoato o iodoacetilo y R<sub>4</sub> una proteína que se selecciona entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura.

25 8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>.

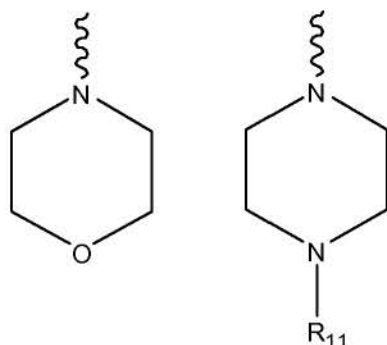
9. Compuesto según la reivindicación 8 donde R<sub>2</sub> es propilo.

10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R<sub>3</sub> se selecciona entre halógeno o heterociclo.

11. Compuesto según la reivindicación 10 donde R<sub>3</sub> se selecciona entre fluor o cloro.

12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R<sub>3</sub> se selecciona entre el siguiente grupo:

30



donde  $R_{11}$  es alquilo  $C_1-C_6$

13. Compuesto según la reivindicación 12 donde  $R_{11}$  es metilo.
- 5 14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde  $R_3$  es  $NR_7R_8$ , siendo  $R_7$  y  $R_8$  un grupo alquilo  $C_1-C_6$  igual o diferente.
15. Compuesto según la reivindicación 14 donde  $R_7$  y  $R_8$  son etilo.
16. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde  $R_3$  es  $NR_7R_8$ , siendo  $R_7$  hidrógeno y  $R_8$  un grupo alquilo  $C_1-C_6$  sustituido.
17. Compuesto según la reivindicación 16 donde  $R_3$  es  $-NH(CH_2)_2NH_2$
- 10 18. Compuesto según la reivindicación 16 donde  $R_3$  es  $-NH(CH_2)_2NHLR_4$ , siendo L 2,4-dicloro-1,3,5-triazina y  $R_4$  una proteína que se selecciona entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovoalbúmina, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura.
19. Compuesto de fórmula (I) que se selecciona del siguiente grupo:
- 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.

15 - 1-(3-(bencidrlitio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.

  - 1-(3-(bencidrlitio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo.
  - Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 1-(3-(bencidrlitio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

20 - Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

  - Ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 7-(2-aminoetilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 1-(3-(bencidrlitio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

25 - Ácido 1-(3-(bencidrlitio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

  - Ácido 6-fluoro-7-(4-metilpiperacin-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
  - Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

30 - Ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(carboxamida de BSA)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

  - Ácido 1-[3-(2-acetamida de HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.

- Ácido 1-[3-(2-acetamida de BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico
- 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 5 - 6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- Ácido 7-[2-(acetamida de BSA)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico.
- 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 10 - 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- 6-fluoro-7-(4-metilpiperacil-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de BSA.
- 6-fluoro-7-(4-metilpiperacil-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida de CONA.
- Ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5-triazin-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico
- 15 o sus sales, isómeros o solvatos,
- 20. Uso de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para la obtención de anticuerpos contra antibióticos del tipo quinolona.
- 21. Uso según la reivindicación 20 donde el antibiótico se selecciona entre marbofloxacino, enrofloxacino, norfloxacino, ciprofloxacino, sarafloxacino, ácido oxolínico, flumequina, ofloxacino, danofloxacino o difloxacino.
- 20 22. Procedimiento de obtención de anticuerpos contra antibióticos del tipo quinolonas que comprende:
  - a) activación de un soporte inmunogénico utilizando un compuesto de unión bifuncional,
  - b) conjugación del soporte inmunogénico activado en (a) con un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19,
  - c) inmunización de un animal no humano con el conjugado obtenido en (b),
  - 25 d) extracción de los anticuerpos generados en (c).
- 23. Procedimiento según la reivindicación 22 donde el soporte inmunogénico se selecciona entre seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, concanavalina A, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de cangrejo herradura, hemocianina de lapa ojo de cerradura.
- 30 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 donde la activación del soporte inmunogénico se realiza haciéndolo reaccionar con ésteres de succinimido o carbodiimidas.
- 25. Anticuerpo obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24.
- 26. Uso de los anticuerpos según la reivindicación 25 para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en una muestra biológica aislada.
- 35 27. Uso de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 como inmunoreactivo secundario para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en una muestra biológica aislada.
- 28. Uso según la reivindicación 26 ó 27 donde la muestra biológica procede de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario.
- 29. Uso según la reivindicación 28 donde el producto de origen animal es leche.
- 40 30. Kit para la detección y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona que comprende al menos un anticuerpo según la reivindicación 25 o un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
- 31. Uso del kit de detección según la reivindicación 30 para la determinación y/o cuantificación de antibióticos tipo quinolona en productos alimentarios de origen animal.





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031721

22 Fecha de presentación de la solicitud: 23.11.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C07D215/233** (2006.01)  
**G01N33/53** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | 56 Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A         | WATANABE, H. ET AL.: "Monoclonal-based ELISA and immuno-chromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices". Analyst, 2002, vol.127, páginas 98-103, todo el documento.   | 1-31                       |
| A         | KANTIANI, L. ET AL.: "Analytical methodologies for the detection of beta-lactam antibiotics in milk and feed samples". Trends in analytical chemistry, 2009, vol. 28, nº 6, páginas 729-744, todo el documento   | 1-31                       |
| A         | ADRIAN, J. ET AL.: "Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, beta-lactam and tetracycline antibiotics in milk". Trends in analytical chemistry, 2009, vol. 28, nº6, página 769-777, todo el documento. | 1-31                       |
| A         | ES 2061734 T3 (SLEYTR, UWE B.) 16.12.1994, todo el documento.  | 1-31                       |
| A         | ES 2043900 T3 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 07.01.1994, todo el documento.  | 1-31                       |
| A         | ES 2156128 T3 (ABBOT LABORATORIES) 16.06.2001, todo el documento   | 1-31                       |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
19.04.2012

Examinador  
H. Aylagas Cancio

Página  
1/4

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

C07D, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, NPL, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.04.2012

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-31 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-31 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación   | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01       | WATANABE, H. ET AL.: "Monoclonal-based ELISA and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices". <i>Analyst</i> , 2002, vol.127, páginas 98-103, todo el documento.   |                   |
| D02       | KANTIANI, L. ET AL.: "Analytical methodologies for the detection of beta-lactam antibiotics in milk and feed samples". <i>Trends in analytical chemistry</i> , 2009, vol. 28, nº 6, páginas 729-744, todo el documento  |                   |
| D03       | ADRIAN, J. ET AL.: "Wavelength-interrogated optical biosensor for multi-analyte screening of sulfonamide, fluoroquinolone, beta-lactam and tetracycline antibiotics in milk". <i>Trends in analytical chemistry</i> , 2009, vol. 28, nº 6, página 769-777, todo el documento. |                   |
| D04       | ES 2061734 T3 (SLEYTR, UWE B.)  | 16.12.1994        |
| D05       | ES 2043900 T3 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)  | 07.01.1994        |
| D06       | ES 2156128 T3 (ABBOT LABORATORIES)  | 16.06.2001        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud se refiere a un compuesto de fórmula I, derivado de quinolonas que lleva un sustituyente que es un soporte inmunogénico seleccionado entre albúmina de suero bovino, concanavalina A, ovalbúmina, peroxidasa de rabano picante, hemocianina de lapa ojo de cerradura o hemocianina de cangrejo herradura. Este compuesto se usa para la obtención de anticuerpos contra antibióticos de tipo quinolona en una muestra biológica aislada, su uso como inmunoreactivo secundario para la detección o cuantificación de antibióticos tipo quinolonas en una muestra biológica aislada que procede de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario (leche).

En los documentos D1- D3 se citan diferentes métodos analíticos para la detección de antibióticos en la leche y muestras alimentarias

Los documentos D4-D6 se refieren a la utilización de conjugados de haptenos y/o sustancias inmunogénicas o inmunostimuladoras unidas a un portador protéico siendo estos haptenos compuestos químicos diferentes a los citados en la presente solicitud.

Ninguno de los documentos citados ni ninguna combinación relevante de ellos, revela compuestos ni el uso descrito en la presente solicitud.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, las reivindicaciones 1-31 de la presente solicitud tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.