

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 500**

51 Int. Cl.:

C07D 215/56 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2011 PCT/ES2011/070800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2011 E 11843286 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2644596**

54 Título: **Haptenos y agentes inmunorreactivos y uso de los mismos para producir anticuerpos de una familia e inmunoensayos para quinolonas**

30 Prioridad:

23.11.2010 ES 201031721 P

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

22.07.2019

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
Serrano 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MARCO COLAS, MARÍA PILAR;
SÁNCHEZ BAEZA, FRANCISCO JOSÉ y
GONZÁLEZ PINACHO, DANIEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 720 500 T3

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

DESCRIPCIÓN

Haptenos y agentes inmunorreactivos y uso de los mismos para producir anticuerpos de una familia e inmunoensayos para quinolonas

- 5 Esta invención se refiere a haptenos, inmunógenos y agentes inmunorreactivos secundarios, para el uso en la producción de anticuerpos de amplio espectro contra antibióticos de quinolona y a su aplicación en técnicas inmunoquímicas para el análisis de dichos antibióticos en muestras biológicas.

Técnica anterior

- 10 Una buena calidad, disponibilidad y seguridad nutricionales alimentarias son esenciales para el bienestar de la sociedad. La necesidad de incrementar la productividad animal ha dado como resultado, en algunas situaciones particulares, el uso inapropiado de fármacos destinados a uso veterinario.

- 15 Más específicamente, los antibióticos de quinolona no solo se usan con propósitos terapéuticos, sino también como medios preventivos a fin de evitar enfermedades en granjas con alta densidad de estabulación. De este modo, se reduce drásticamente la eficacia del tratamiento, cuando estas bacterias son la fuente de enfermedades humanas.

- 20 Por consiguiente, la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) ha establecido límites residuales máximos (MRLs) en los diferentes productos alimenticios de origen animal en su directiva acerca de seguridad alimentaria 2377/90/CE. La Agencia también ha impuesto una serie de directrices a los laboratorios de inspección acerca de la frecuencia de muestreo y el número de sustancias que se han de controlar antes de que estos productos estén disponibles para los consumidores (Directiva 96/23/CE). Esto crea la necesidad de llevar a cabo un alto número de análisis.

- 25 Técnicas que se usan actualmente para la detección de quinolonas son principalmente cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con varios tipos de detección (principalmente espectrometría ultravioleta y de masas) (Hernández-Arterseros, J. Chromatography A. 2002, 945, 1-24). La principal desventaja de estas técnicas es que requieren instrumentación compleja y personal experto, así como una preparación previa para la muestra, lo que prolonga el tiempo del análisis.

- 30 También se usan ensayos microbiológicos que, aunque sean menos costosos, el retraso para obtener resultados más su propia metodología los convierte en métodos inviables para una alarma rápida. Por lo tanto, los métodos actuales para el análisis y la preparación de muestras no responden apropiadamente a los requisitos legislativos referentes a la protección de la salud pública. Los procedimientos inmunoquímicos proporcionan importantes ventajas tales como procedimientos de cribado, debido a su simplicidad, costes y altas capacidades de procesamiento.

- 40 La bibliografía ya ha descrito varios inmunoensayos genéricos para quinolonas. En cualquier caso, el hapteno de inmunización era una quinolona comercial unida a una proteína inmunogénica por medio de 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 a través de la piperacina restante en la posición 7 (Huet, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 2822-2827), bloqueando así epítomos comunes e importantes procedentes de la familia de quinolonas.

- 45 La técnica anterior no se dirige al método para ligar el hapteno de quinolona al portador inmunogénico a través de la posición 1. De este modo, los haptenos retienen todos los epítomos característicos de las quinolonas, maximizando su exposición al sistema inmunitario del animal hospedador mientras que mantienen intactas las propiedades ácido-base de estos compuestos.

- 50 La presente invención proporciona dichos haptenos y agentes inmunorreactivos derivados de los mismos, que son útiles para obtener anticuerpos de una familia mejorados contra quinolonas y proporcionan mejores beneficios cuando se usan en inmunoensayos para la detección de quinolonas.

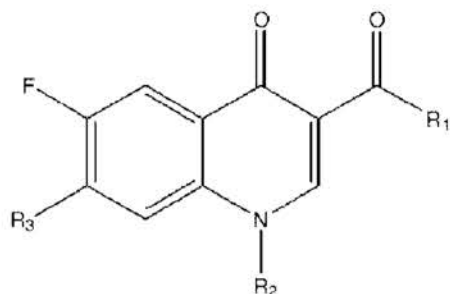
Descripción de la invención

- 55 La presente invención se refiere a un grupo de haptenos que están estructuralmente relacionados, desde una perspectiva química, con los antibióticos de quinolona. Asimismo, la invención se refiere a agentes inmunorreactivos derivados de la unión de dichos haptenos a portadores inmunogénicos y su uso para obtener anticuerpos con una selectividad de clase para la familia de las quinolonas. La invención también hace referencia al uso de cualquiera de estos agentes inmunorreactivos como agentes inmunorreactivos secundarios, y de cualquier anticuerpo producidos de los mismos, en métodos inmunoquímicos para el análisis de quinolonas en muestras biológicas.

60

Según un aspecto de la invención, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) que es opcionalmente un conjugado de una proteína inmunogénica R₄, seleccionada del grupo que consiste en albúmina sérica bovina (BSA), concanavalina A (CONA), ovoalbúmina (OVA), peroxidasa de rábano picante (HRP), hemocianina de lapa californiana (KLH) y hemocianina de cangrejo herradura (HCH):

5



(I)

o sales o solvatos del mismo, en donde:

R₁ se selecciona del grupo que consiste en OH y O-alquilo C₁-C₁₀;

10 R₂ es -(CH₂)_m-R₅R₆, donde m es un valor entre 1 y 6, R₅ es S y R₆ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₆, arilo, alquil-arilo y R₄ o LR₄, donde L es un compuesto de conexión bifuncional;

R₃ se selecciona del grupo que consiste en un compuesto heterocíclico, un halógeno y NR₇R₈, donde R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₆ y -(CH₂)_n-R₉R₁₀, en donde n representa un valor de 1 a 6, R₉ se selecciona de S, O o NH y R₁₀ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₆, arilo, alquil-arilo; o un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido 7-[2-(BSA acetamido)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico y ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5-triacino-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico.

15

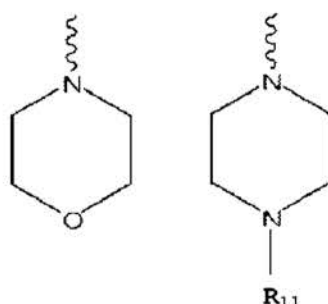
Preferiblemente, R₁ es O-alquilo C₁-C₆ y más preferiblemente, O-etilo.

20 Preferiblemente, R₅ es S y R₆ es H o LR₄, siendo L maleimidopropanoato o yodoacetilo.

Preferiblemente, R₃ se selecciona del grupo que consiste en flúor o cloro.

Preferiblemente, R₃ se selecciona del siguiente grupo:

25



en el que R₁₁ es alquilo C₁-C₆ o H, y preferiblemente metilo.

30 Preferiblemente, R₃ es NR₇R₈, en donde R₇ y R₈ son un grupo alquilo C₁-C₆, que puede ser igual o diferente. Más preferiblemente, R₇ y R₈ son etilo.

Preferiblemente, R₃ es NR₇R₈, en donde R₇ es H y R₈ es un grupo alquilo C₁-C₆, que puede estar sustituido. Más preferiblemente, R₃ es -NH(CH₂)₂NH₂.

35

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

1-(3-(benzhidrilito)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato de etilo;

ácido 1-(3-(benzhidrilito)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;

ácido 1-(3-(benzhidrilitio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;

ácido 1-(3-(benzhidrilitio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;

ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;

ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;

5 ácido 1-[3-(2-acetamido BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico.

ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(BSA carboxamido)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;

ácido 1-[3-(2-acetamido HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;

10 ácido 1-[3-(2-acetamido BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico, o sales de los mismos o solvatos de los mismos.

15 "Alquilo" se define en la presente como cadenas hidrocarbonadas lineales o ramificadas de radicales que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6, que están ligados al resto de la molécula por un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tales como halógeno (denominado haloalquilo), hidroxilo, alcoxi, arilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquilitio.

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

25 "Heterociclo" se refiere en la presente a un radical anular estable de 3-15 miembros que consiste en átomos de carbono y 1-5 heteroátomos seleccionados del grupo comprendido por nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 4-8 miembros con uno o más heteroátomos, y más preferiblemente, un anillo de 5 o 6 miembros con uno o más heteroátomos. Para los propósitos de esta invención, el heterociclo puede ser un anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas anulares condensados, y el átomo de nitrógeno, carbono o azufre del radical heterociclo puede estar opcionalmente oxidado, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado y el radical heterocíclico puede estar parcialmente o totalmente saturado o ser aromático. Ejemplos de dichos heterociclos incluyen, pero no se limitan a, azepinas, bencimidazol, benzotiazol, furano, isotiazol, indol, piperidina, piperacina, azatioprina, quinolina, tiadiazol, tetrahidrofurano, cumarina, morfolina, pirrol, pirazol, oxazol, isoxazol, triazol, imidazol, entre otros.

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

35 "Portador inmunogénico" se refiere a los materiales que tienen la propiedad de generar independientemente una respuesta inmunitaria en el animal hospedador y que se pueden unir covalentemente a los haptenos descritos en la presente invención. Un material portador adecuado incluye, a modo de ejemplo, compuestos poliméricos naturales o sintéticos, tales como polipéptidos y oligonucleótidos y proteínas, tales como albúmina, proteínas séricas, globulinas, lipoproteínas y hemocianinas. Ejemplos ilustrativos de portador inmunogénico incluyen proteína sérica bovina, ovoalbúmina, concaivalina A, hemocianina de lapa californiana y hemocianina de cangrejo herradura.

Dado que los compuestos de fórmula (I) tienen grupos y átomos capaces de perder o ganar cargas, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I) en la forma de una sal.

45 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) y, más específicamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta fórmula general descrita anteriormente pueden estar comprendidos por 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 enantiómeros o diastereoisómeros y las mezclas de los mismos se encuentran dentro del alcance de esta invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros, y sus mezclas, se pueden separar mediante técnicas convencionales.

55 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) según se describe anteriormente para producir anticuerpos de amplio espectro contra antibióticos de quinolona. Ejemplos de quinolonas son, pero sin limitación, marbofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin, ácido oxolínico, flumequina, ofloxacin, danofloxacin o difloxacin.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método no terapéutico para producir anticuerpos contra antibióticos de quinolona, que comprende:

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

10 El portador inmunogénico puede ser cualquier polímero, oligonucleótido, polipéptido o proteína sintéticos o naturales para la conjugación de haptenos conocido en la técnica, pero preferiblemente seleccionado de proteínas tales como albúmina sérica bovina, ovoalbúmina, concanavalina A, peroxidasa de rábano picante, hemocianina de lapa californiana o hemocianina de cangrejo herradura.

15 La activación del portador inmunogénico se puede realizar mediante cualquier técnica bioquímica conocida, aunque en el procedimiento de esta invención se realiza preferiblemente al hacer reaccionar el portador inmunogénico con ésteres succinimidílicos como el compuesto de conexión bifuncional.

20 "Compuesto de conexión bifuncional" se refiere a los compuestos que tienen dos grupos funcionales, habitualmente en extremos opuestos de la molécula, que son capaces de reaccionar con otros grupos funcionales incorporados bien a haptenos o bien a portadores inmunogénicos. Si los grupos funcionales con los que deben reaccionar son idénticos, estos compuestos son compuestos de conexión homobifuncionales, y si los grupos con los que deben reaccionar son diferentes, estos compuestos son compuestos de conexión heterobifuncionales.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo que se obtiene por medio del procedimiento descrito.

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

30 Otro aspecto de la presente invención hace referencia al uso de los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente como agentes inmunorreactivos secundarios para la detección y/o la cuantificación de antibióticos de quinolona en una muestra biológica aislada. Preferiblemente, esta muestra biológica deriva de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario y, más preferiblemente, son muestras de leche.

35 Los "agentes inmunorreactivos secundarios" se definen como los reactivos necesarios en un inmunoensayo competitivo para la detección de moléculas de bajo peso molecular. Pueden ser antígenos de revestimiento, que se usan en inmunoensayos competitivos de formato indirecto, y en cuyo caso están ligados al soporte sólido y compiten con el analito por el anticuerpo en solución. Cantidades vestigiales pueden ser enzimáticas, fluorescentes o radiactivas, que se usan en inmunoensayos competitivos de formato directo, y en cuyo caso compiten en solución con el analito por el antígeno inmovilizado sobre el soporte sólido.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un estuche para la detección y/o la cuantificación de antibióticos de quinolona que comprende al menos un anticuerpo o compuesto de fórmula (I), según se describe anteriormente. Los componentes del estuche pueden estar ligados a diferentes tipos de portadores conocidos en la técnica anterior, tales como nitrocelulosa, para placas de poliestireno, o una prueba con tira reactiva para ensayos ELISA. Además, el estuche puede incluir otros componentes y reactivos necesarios para llevar a cabo el análisis de muestras.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del estuche de detección descrito anteriormente para determinar y/o cuantificar antibióticos de quinolona en productos alimenticios de origen animal. Ejemplos ilustrativos de productos alimenticios de origen animal incluyen leche y productos lácteos, huevos, carne (músculo, riñón, hígado, etc.) de diferentes especies animales.

50 El uso del término "comprender" y sus variantes a lo largo de las secciones de descripción y reivindicaciones no pretende excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la técnica, otros objetivos, ventajas y rasgos de la invención se harán evidentes a partir de la memoria descriptiva y la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no están destinados a limitar la presente invención. Compuestos que se encuentran fuera del alcance de las reivindicaciones se incluyen como ejemplos de referencia.

Ejemplos

Síntesis de Haptenos

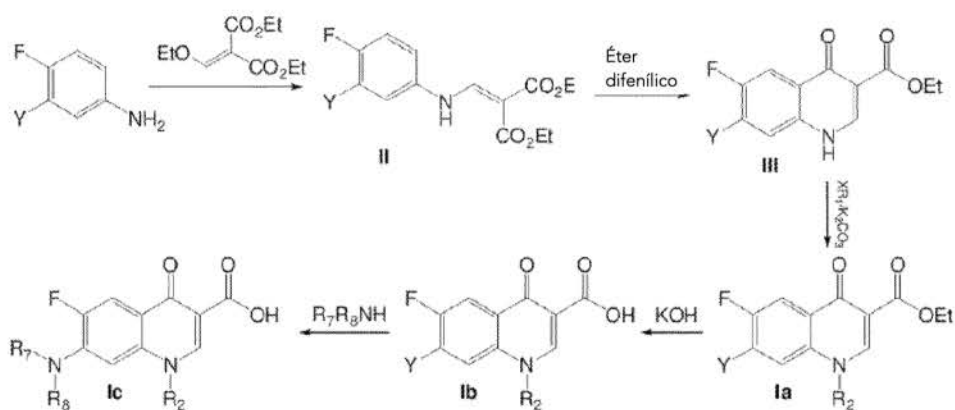
5 Los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar según diversos métodos conocidos por cualquier experto en el campo de la síntesis orgánica, particularmente, los procedimientos generales que se muestran en los siguientes esquemas. Materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o se pueden preparar usando los métodos descritos en la bibliografía.

Los compuestos de fórmula (I) se pueden obtener a partir de los métodos y los esquemas descritos posteriormente:

10 Según el método de Goulds-Jacobs (véase el esquema 1), la anilina correspondiente se hace reaccionar con etoximetilnomalonato de dietilo en una reacción de adición-eliminación para obtener el malonato **II**. A continuación, se hace reaccionar en éter difenílico a alta temperatura para dar lugar a la 4-oxoquinolina **III**. Después de eso, el nitrógeno de la quinolona se alquila con un haluro en un medio básico para obtener la 1-alkil-4-oxoquinolina(sustituída) **Ia**. El éster se hidroliza 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**.

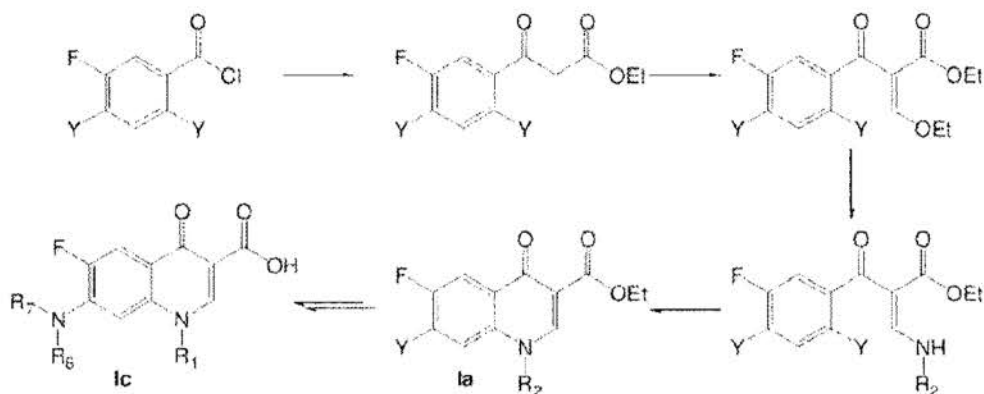
20 En caso de que la amina usada para formar el compuesto **Ic** sea piperacina, la secuencia se continúa metilando el nitrógeno de la piperacina usando formaldehído y ácido fórmico o cualquier agente metilante como yoduro de metilo o sulfato de dimetilo.

Esquema 1



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

Esquema 2



- 5 Las aminas y el haluro de alquilo usados están disponibles comercialmente o se pueden obtener a través de métodos conocidos (March, *Advanced Organic Chemistry*. 1991, Ed. John Wiley & Sons).

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

10 Preparación de Agentes Inmunorreactivos

Los agentes inmunorreactivos de fórmula (I) se pueden preparar según diversos modelos conocidos para cualquier experto en el campo de la síntesis orgánica e inmunoquímica, particularmente, procedimientos generales que se muestran en los siguientes esquemas. Materias primas para métodos preparativos están disponibles comercialmente o se pueden preparar usando los métodos descritos en la bibliografía.

15 a) Haptenos con un grupo tiol

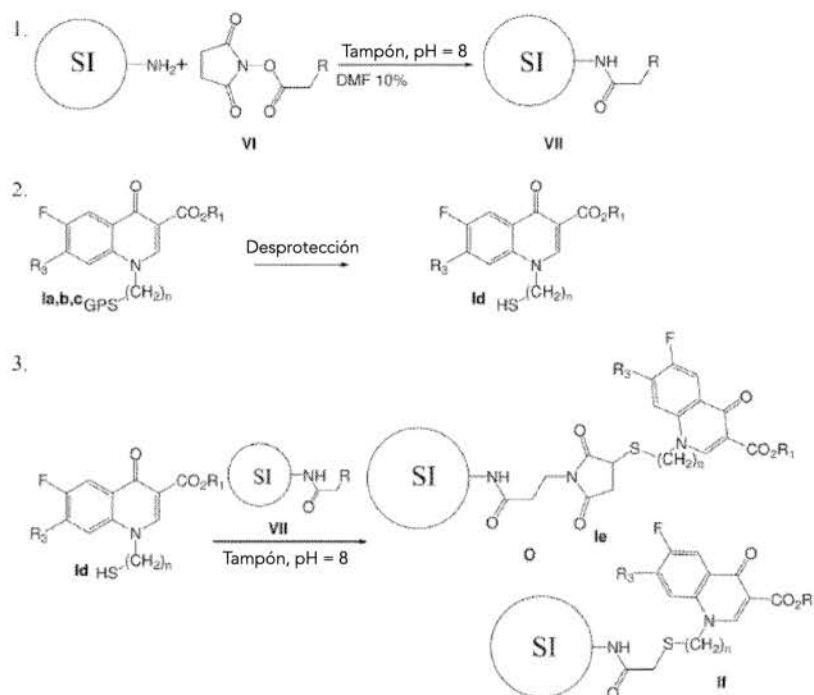
Haptenos con un grupo tiol se ligan covalentemente a portadores inmunogénicos (SI), que se activan con grupos capaces de reaccionar con dicho grupo tiol (véase el esquema 3) por medio de compuestos de conexión heterobifuncionales.

- 20 1. Activación de portadores inmunogénicos. Los portadores inmunogénicos se hacen reaccionar con ésteres succinimídicos o con cualquier otro éster activo o activador de la reactividad de ácidos carboxílicos, que tienen en su estructura rasgos reactivos con el grupo tiol.

2. Desprotección de grupos tiol. En paralelo, se procede a la desprotección de grupos tiol siguiendo una metodología apropiada para el correspondiente grupo protector.

3. Inmunoconjugado. El hapteno desprotegido se hace reaccionar con portador inmunogénico activado.

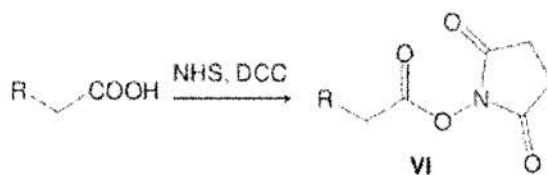
Esquema 3



5 Agentes activadores para ácidos carboxílicos están disponibles comercialmente, al igual que los ésteres succinimidílicos, o se pueden obtener por medios conocidos (March, *Advanced Organic Chemistry*. 1991, Ed. John Wiley & Sons) o usando los esquemas descritos posteriormente como un ejemplo.

10 Se pueden obtener ésteres succinimidílicos a través de la reacción del ácido correspondiente con N-hidroxisuccinimida usando cualquier carbodiimida como un activador, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida (véase el esquema 4, Hampton, *J. Med. Chem.* 1976, 19, 1279-1283).

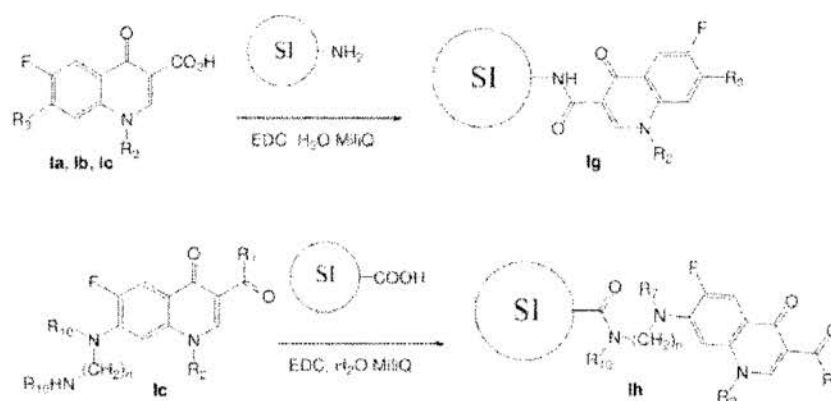
Esquema 4



b) Haptenos con grupo NH o COOH

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

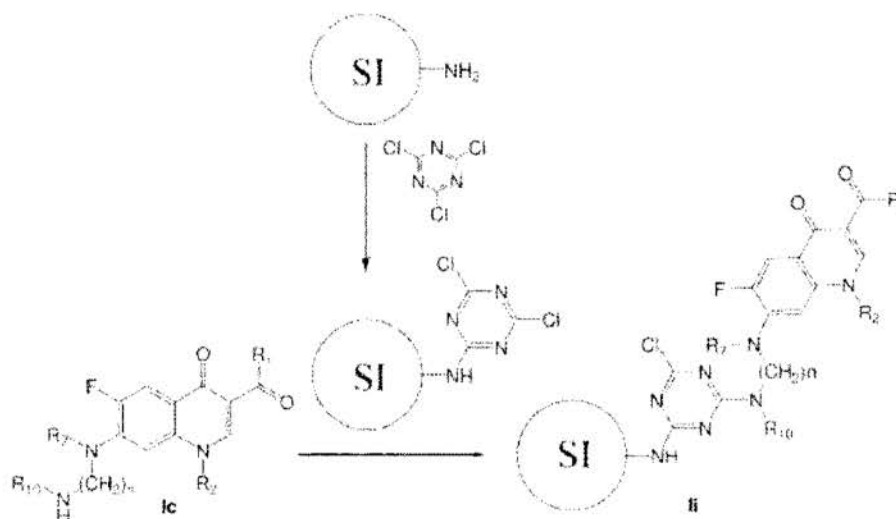
Esquema 5



c) Haptenos con grupos NH₂

- 5 En el caso de haptenos con grupos amina, también se conjugan con portadores inmunogénicos que previamente son funcionalizados a través de sus grupos amina, usando un compuesto de conexión homobifuncional. Estos compuestos de unión homobifuncionales pueden ser cloruro cianúrico, bis-imidoésteres, bis-N-succinimido, diisocianatos o diisotiocianatos, biacilicidas, dialdehídos, dicetonas o cualquier compuesto capaz de reaccionar con varios grupos amina en diferentes etapas (véase el esquema 6).

Esquema 6



10

Se procederá a ilustrar la invención usando algunas pruebas realizadas por los inventores, que muestran la especificidad y la eficacia de compuestos de fórmula (I) como haptenos y agentes inmunorreactivos para la producción de anticuerpos anti-fluoroquinolona y el desarrollo de inmunoensayos para detectar dichos antibióticos.

A. QUÍMICA

15 Procedimientos y Equipo Generales

La cromatografía en capa fina se realizó sobre láminas de aluminio prerrevestidas con gel de sílice 60 F254 (Merck, Gibbstown, NJ), y la separación de los diferentes compuestos sintetizados, cuando fuera necesario, se llevó a cabo por medio de cromatografía en columna usando gel de sílice 60 A C.C. (37-70 μm SDS). Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C se obtuvieron usando el espectrómetro Mercury-400 Varian (Varian Inc., Palo Alto, CA) (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C). Los reactivos químicos usados en esta síntesis se obtuvieron de ACROS ORGANICS (Geel, Bélgica).

20

Preparación de Productos Intermedios

Producto Intermedio II

5 Una mezcla de la 3,4-dihaloanilina correspondiente (10 mmol) se calentó junto con etoximetilnomalonato de dietilo (10 mmol) a 120°C con agitación. Una corriente suave de nitrógeno se hizo pasar durante las 2 horas de la reacción a fin de retirar el etanol formado. Posteriormente, la mezcla se secó bajo presión reducida para obtener el producto deseado.

Usando esta metodología y la anilina correspondiente, se prepararon los siguientes malonatos:

10 2-[(3-cloro-4-fluorofenilamino)metileno]malonato de dietilo (**IIa**, 90% de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃) δ 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). RMN ¹³C (CDCl₃) δ 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)

15 155,28 (1 C, d, J=247,05 Hz), 165,42 (1 C, s), 168,91 (1 C, s).

20 2-[(3,4-difluorofenilamino)metileno]malonato de dietilo (**IIb**, 90% de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃) δ 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). RMN ¹³C (CDCl₃) δ 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).

Producto Intermedio III

25 El malonato **II** correspondiente (9 mmol) se disolvió en éter difenílico (15 ml) y la solución resultante se calentó hasta reflujo. Después de 2 horas, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió hexano. El sólido resultante se filtró, se lavó y se secó para obtener el producto deseado.

Usando esta metodología, y el malonato correspondiente, se prepararon los siguientes 4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilatos:

30 7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolona-3-carboxilato de etilo (**IIIa**, 92% de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃) δ 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); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 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).

35 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato de etilo (**IIIb**, 85% de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm: 1,33 (3 H, t, J=7,14 Hz), 4,49 (2 H, q, J=7,07 Hz), 7,83 (1 H, d, J=8,87,6,31 Hz), 8,20 (1 H, t, J=8,33 Hz), 9,14 (1 H, s); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 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 (2C, s) 174,35 (1 C, d, J=4,27 Hz).

Producto intermedio IV

45 Una mezcla de cloroalquiltio (15 mmol) y difenilmetanol (15 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (30 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con agitación magnética a temperatura ambiente. La reacción se terminó después de 2 horas según se observaba mediante cromatografía en capa fina (diclorometano como eluyente). La mezcla se secó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en éter dietílico y se lavó con agua y salmuera. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato magnésico anhidro y se evaporaron hasta sequedad para obtener el producto deseado.

Usando esta metodología, y el cloroalquiltio correspondiente, se prepararon los siguientes compuestos:

5 *benzhidril(3-cloropropil)sulfano (IVa, 90% de rendimiento)*. RMN ¹H (CDCl₃) δ 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 ¹³C (CDCl₃) δ 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).

Producto Intermedio V

10 Una mezcla de yoduro sódico (25 mmol) y **IV** (13 mmol) se disolvió en acetona (25 ml) y se puso a reflujo bajo una atmósfera inerte con agitación. Después de 7 horas, se observaba mediante RMN ¹H la conversión completa del átomo de cloro. La mezcla se secó a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en metil-terc-butil-éter y se lavó con agua y bisulfito sódico saturado en agua. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad para obtener el producto deseado.

15 Usando esta metodología, y el cloroalquiltio protegido correspondiente, se prepararon los siguientes compuestos:

benzhidril(3-yodopropil)sulfano (Va, 80% de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃) δ 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 ¹³C (CDCl₃) δ 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).

20 Producto Intermedio VI

25 A una solución de N-hidroxisuccinimida (12,6 mmol) y dicitclohexilcarbodiimida (20,3 mmol) a 0°C se añadió el ácido correspondiente (6 mmol) y se dejó reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente. En el caso del compuesto **Vla**, se añadió una solución de anhídrido maleico (10 mmol) y β-alanina en N,N-dimetilformamida, que previamente se ha hecho reaccionar durante 1 hora. Después de 4 horas, la mezcla se evaporó a presión reducida y el producto en bruto se disolvió en diclorometano y se lavó con agua. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se evaporaron hasta sequedad. El residuo resultante se recristalizó para dar el compuesto deseado.

Usando esta metodología, y el ácido correspondiente, se prepararon los siguientes compuestos:

30 *maleimidopropionato de 3-succinimidilo (Vla, 25% de rendimiento)*. RMN ¹H (CDCl₃) δ 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); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 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).

yodoacetato de succinimidilo (Vlb, 30% de rendimiento). RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm: 2,87 (2 H, s), 3,96 (1 H, s); RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm: - 12,47 (1 C, s) 25,85 (2 C, s) 164,78 (1 C, s) 168,78 (2 C, s).

35 Preparación de Haptenos

Hapteno Ia

40 Se añadió carbonato potásico anhidro (5 mmol) a una solución del 4-oxo-dihidroquinolino-3-carboxilato **III** correspondiente (2 mmol) y haluros de alquilo (**V** sustituido) (10 mmol) en DMF anhidra (5 ml) y se agitaron durante 10 horas a 110°C en atmósfera inerte. La mezcla se evaporó bajo vacío y el residuo resultante se disolvió en diclorometano y se lavó con agua y bisulfito sódico saturado en agua. La fase orgánica se secó con MgSO₄ y se evaporó hasta sequedad. Cuando fuera necesario, el producto en bruto se purificaba por medio de cromatografía líquida sobre gel de sílice usando diclorometano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil para obtener el producto deseado.

45 Usando esta metodología, y el 4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato correspondiente, se prepararon los siguientes 1-alkil-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilatos:

50 *6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato de etilo (I1, 80% de rendimiento)*. RMN ¹H (TFAd) δ 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 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 ¹³C (TFAd) δ 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).

1-(3-(benzhidrilitio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato de etilo (**I2**, 80% de rendimiento). RMN 1H (DMSO-D6) δ 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); RMN 13C (DMSO-D6) δ 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).

1-(3-(benzhidrilitio)propil)-6-7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato de etilo (**I3**, 75% de rendimiento). RMN 1H (TFAd) δ 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); RMN 13C (TFAd) δ 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

Una solución de 4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato o el **III** o **Ia** correspondiente (1 mmol) e hidróxido potásico (2,5 mmol) se sometió a reflujo en una mezcla de THF:agua (3:1, 4 ml) con agitación durante 4,5 horas. El producto en bruto de la reacción se vertió sobre una mezcla de hielo-agua (50 ml), se acidificó con HCM 1 M; el precipitado resultante se filtró y se lavó con agua fría para obtener los ácidos carboxílicos correspondientes.

Usando esta metodología, y el carboxilato correspondiente, se prepararon los siguientes ácidos carboxílicos:

ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (**I4**, 80% de rendimiento). RMN 1H (TFAd) δ 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 13C (TFAd) δ 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).

ácido 6,7-difluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (**I5**, 95% de rendimiento), RMN 1H (TFAd) δ 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); RMN 13C (TFAd) δ 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).

ácido 1-(3-(benzhidrilitio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (**I6**, 85% de rendimiento), RMN 1H (DMSO-D6) δ 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 13C (101 MHz, DMSO-D6) δ 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

Una solución de la 4-oxo-1,4-dihidroquinolina **Ia** o **Ib** (0,75 mmol) y la amina correspondiente (1,9 mmol) se calentó en DMSO anhidro (2 ml) a 110°C en atmósfera inerte. Después de 5 horas, el disolvente se retiró a alto vacío y el residuo se disolvió en diclorometano y se lavó con agua y salmuera. Finalmente, la fase orgánica se secó con MgSO₄ y se evaporó hasta sequedad.

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

5 *ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (17, 60% de rendimiento)*. RMN ¹H (TFAd) δ 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 ¹³C (TFAd) δ ppm 50,96 (2 C, d, J=6,41 Hz), 67,74 (2 C, s) 104,42 (1 C, 30 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, m) 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).

10 *ácido 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (18, 70% de rendimiento)*. RMN ¹H (TFAd) δ 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 ¹³C (TFAd) δ 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).

15 *ácido 7-(2-aminoetilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (19, 60% de rendimiento)*. RMN ¹H (TFAd) δ 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, s) 4,48 (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 ¹³C (TFAd) δ 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).

20 *ácido 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (110, 90% de rendimiento en recipiente presurizado)*. RMN ¹H (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 ¹³C (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).

25 *ácido 1-(3-(benzhidrilitio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (111, 70% de rendimiento)*. RMN ¹H (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 ¹³C (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).

35 *ácido 1-(3-(benzhidrilitio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacínil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico. (1112, 95% de rendimiento)*. RMN ¹H (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, t, 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); RMN ¹³C (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).

Hapteno Ic2

40 Una solución del fluoroquinolonopiperacínilo **Ic1** correspondiente (0,5 mmol) y formaldehído (2 mmol) se agitó en ácido fórmico (1 ml) a 110°C durante 2,5 horas y la mezcla se evaporó hasta sequedad.

45 Usando esta metodología, y el fluoroquinolinopiperacínilo correspondiente, se preparó la siguiente metilpiperacínifluoroquinolona:

50 *ácido 6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico. (113, rendimiento cuantitativo)*, RMN ¹H (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 ¹³C (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

Procedimientos y Equipo Generales

La desprotección del grupo tiol de los haptenos correspondientes se comprobó por medio de HPLC-UV, usando una bomba Merck-Hitachi I-7100 equipada con un detector de serie de diodos L-7455, un automuestreador L-7200 y una interfaz D7000 (Merck, Darmstadt, Alemania). Los cromatogramas se procesaron usando el software HSM (Merck, Darmstadt, Alemania). Se usó una columna Lichrospher 100 RP-18 125x4 (5 mm; Merck, Darmstadt, Alemania) y los análisis se llevaron a cabo en modo de gradiente usando acetonitrilo (ACN):tampón de citrato (50 mM, pH=3) como fase móvil hasta un flujo de 1,0 ml min⁻¹. Las reacciones se comprobaron a dos longitudes de onda: 330 nm y 280 nm. La MALDI-TOF-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) usada para analizar conjugados proteínicos era una Perspective BioSpectrometry Workstation equipada con 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 Hapténica

Las densidades hapténicas de conjugados proteínicos se estimaron por medio de MALDI-TOF-MS comparando el peso molecular de proteínas naturales con el de los conjugados. Los experimentos de MALDI se efectuaron al mezclar 2 µl de matriz (ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico, 10 mg ml⁻¹ en ACN/H₂O 70:30, TFA al 0,1%) recientemente preparada con 2 µl de conjugados o conjugados proteínicos en ACN/H₂O 70:30, TFA al 0,1% (5 mg ml⁻¹). La densidad hapténica se estimó (\bar{O}_{Hapteno}) según la siguiente ecuación: [PM(Conjugado)-PM(Proteína)] / PM(Hapteno).

El pH y la conductividad de todos los tampones y las soluciones se midieron con un pehachímetro pH 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Se adquirieron placas de microvaloración de poliestireno de Nunc (Maxisorp, Roskilde, DK). Se llevaron a cabo interrupciones del lavado de ELISA mediante un lavador de microplacas PW SLY96 (SLT Labinstruments GmbH, Salzburg, Austria). Las absorbancias se leyeron en un SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las curvas de competición 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).

Productos Químicos e Inmunoquímicos

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

Tampones

La solución salina tamponada con fosfato (PBS) es una solución de tampón de fosfato 0,01 M en solución salina al 0,8%, y el pH es 7,5. PBST es PBS con 0,05% de Tween 20. El tampón de borato es ácido bórico / borato sódico 0,2 M pH=8,7. El tampón de revestimiento es un tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. El tampón de citrato es una solución de citrato sódico 0,04 M, pH 5,5. La solución de sustrato contiene 0,01% de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y 0,004% de H₂O₂ en tampón de citrato.

Preparación de Agentes Inmunorreactivos

Agentes inmunorreactivos le e lf

La haptización de portadores inmunogénicos en el caso de haptenos que tienen un grupo tiol se llevó a cabo mediante una secuencia de tres fases, que se describe posteriormente.

Fase 1: Activación de proteínas (VII). Una solución del éster succinimidílico **VI** correspondiente (70 µmol) en DMF anhidra (400 µl) se añadió gota a gota a una solución de proteína (15 mg) en tampón de borato y el pH se ajustó hasta 8 usando trietilamina. La mezcla se mantuvo a 4°C durante la noche y la proteína activada mediante cromatografía de exclusión se purificó usando una columna de desalado Sephadex G-25 Superfine HiTrap de 5 ml (Amersham Biosciences) y tampón de borato como eluyente. Las fracciones eluidas de proteínas activadas se recogieron (0,5 ml), y aquellas con resultado positivo se combinaron en el ensayo de proteína de Bradford (3 ml) (Bradford, M. M. Analytical Biochemistry 1976, 72, 248-254). Parte de esta solución se reservó para el análisis por MALDI-TOF-MS y el resto se usó para conjugación según se describe en la Fase 3.

Así, usando el éster succinimidílico correspondiente, se activaron las siguientes proteínas:

3-maleimidopropanoato BSA (**V11a**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 31,29.

Yodoacetato BSA (**V11b**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 15,62.

5 Fase 2. Desprotección (Id). El hapteno se disolvió con el grupo protegido **la, b, c** (0,18 mmol) y anisol (2,74 mmol) en ácido trifluoroacético (2 ml) y la mezcla resultante se agitó a 45°C durante 1,5 h hasta que se observaba la conversión total de la materia prima a través de HPLC-UV. En este momento, el disolvente se evaporó hasta sequedad bajo vacío y el residuo se disolvió en agua y se lavó con diclorometano. La capa acuosa se usó inmediatamente para la conjugación sin purificación adicional, según se describe en la Fase 3.

10

Así, se obtuvieron los haptenos correspondientes con grupo tiol libre:

15 *ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico* (**I14**, 68% de rendimiento), RMN ¹H (CDCl₃) 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 ¹³C (CDCl₃) 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).

20 *ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperaciniil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico* (**I15**, 45% de rendimiento), RMN ¹H (D₂O) 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); RMN ¹³C (D₂O) 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).

25 Fase 3 Bioconjugación (Ie, If). La fase acuosa de hapteno con grupo tiol desprotegido **Id** de la Fase 2 se añadió gota a gota a la solución de proteína activada **VII** purificada en la Fase 1. El pH se ajustó hasta 8 usando trietilamina. La mezcla se mantuvo bajo agitación suave durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los agentes inmunorreactivos se purificaron mediante análisis contra PBS 0,5 mM (4x5 l) y agua milliQ (1x5 l) y a continuación se liofilizaron.

30

Usando esta metodología, se prepararon los siguientes agentes inmunorreactivos:

ácido 1-[3-(2-acetamido BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico. (**I16**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 2,23.

35 *ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(BSA carboxamido)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperaciniil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico*. (**I17**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 12,46.

ácido 1-[3-(2-acetamido HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperaciniil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico. (**I18**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína) (UV cuantitativo): 14,37

ácido 1-[3-(2-acetamido BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperaciniil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico. (**I19**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 14,15.

40 Agentes inmunorreactivos Ig e Ih

La haptenización de portadores inmunogénicos en el caso de haptenos que tienen un grupo ácido o amino se llevó a cabo como sigue.

45 Una solución de hapteno **Ib, c** (10 μ mol) en DMF (100 μ l) se añadió a una solución de proteína (10 mg) en agua milliQ (1 ml) seguido por la adición de solución de EDC (50 μ mol) en agua milliQ (100 μ mol) y a continuación la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Los conjugados proteínicos se purificaron mediante diálisis contra PBS 0,5 mM (4x5 l) y agua milliQ (1x5 l) y a continuación se liofilizaron.

Usando esta metodología, se prepararon los siguientes agentes inmunorreactivos:

50 *6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido BSA*. (**I20**). MS δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 7,11.

6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido CONA (**I21**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 2,60.

6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido BSA (**I22**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 3,74.

6,7-difluoro-1-propil-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido CONA (**I23**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 1,09.

6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido BSA (**I24**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 1,37.

5 6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido BSA (**I25**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 1,79.

ácido 7-[2-(BSA acetamido)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico (**I26**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 5,28.

10 7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido BSA (**I27**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 4,62.

7-(dietilamino)-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido CONA (**I28**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 4,30.

6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido BSA (**I29**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 2,16.

15 6-fluoro-7-(4-metilpiperacín-1-il)-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxamido CONA (**I30**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 1,36.

Agente inmunorreactivo li

La haptenización de portadores inmunogénicos en el caso de haptenos que tienen un grupo amino se llevó a cabo mediante una secuencia de dos fases, que se describe posteriormente.

20 Una solución de cloro cianúrico (1,5 μmol) se añadió en DMF (150 μl) a una solución de proteína (6 mg) en tampón de carbonato con pH 9,6 (1 ml). La mezcla se mantuvo bajo temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación una solución del hapteno **Ic** correspondiente (2 μmol) se añadió gota a gota en DMF (60 μl). La mezcla se mantuvo bajo agitación suave durante 4 horas a 37°C. Finalmente, los agentes inmunorreactivos se purificaron mediante diálisis contra PBS 0,5 mM (4x5 l) y agua milliQ (1x5 l) y a continuación se liofilizaron.

25

Usando esta metodología, se prepararon los siguientes agentes inmunorreactivos:

ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5,-triacino-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico. (**I31**). δ_{Hapteno} (mol Hapteno/mol proteína): 1,76.

30 Preparación de Antisuero Policlonal

El protocolo de inmunización se efectuó en conejos blancos hembra de Nueva Zelanda que pesaban 1-2 kg, según se describe previamente (Salvador, Analytical Chemistry. 2007, 79, 3734-3740). Inmunógenos (100 μg) disueltos en PBS (0,5 ml) se emulsionaron con adyuvante de Freund, completamente la primera vez y el resto de forma incompleta, en una relación 1:1. Se inyectaron con rapidez intradérmicamente en diferentes zonas del lomo del animal hospedador (una inyección al mes). La evolución de los títulos de anticuerpos se evaluó al medir la unión a diluciones en serie de diferente antisuero en placas de microvaloración revestidas con el agente inmunorreactivo correspondiente. Después de observar un título de anticuerpo aceptable, los animales se desangraron hasta la muerte y su sangre se recogió en tubos Vacutainer equipados con un gel separador de suero. Los antisueros se obtuvieron mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C en presencia de NaN_3 al 0,02%.

40 Desarrollo de ELISAs indirectos competitivos para quinolonas

Las placas de microvaloración se revistieron con el correspondiente antígeno (formato indirecto) o antisuero (formato directo) de revestimiento disuelto en tampón de revestimiento (100 μl /pocillo) durante la noche a 4°C o durante 4 horas a temperatura ambiente y se cubrieron con placas adhesivas herméticas. Posteriormente, las placas se lavaron con PBST (cuatro veces, 300 μl /pocillo) y se añadieron patrones de quinolona (0,01 nM – 10000 nM, en PBST, 50 μl /pocillo) seguido por el correspondiente antisuero (formato indirecto) o rastreador enzimático (formato

45

directo) (50 µl/pocillo) en placas de microvaloración. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron según se describe anteriormente y, en el caso del formato indirecto, una solución de IgG anti-IgG de conejo marcado con HRP (1/6000 en PBST) (100 µl/pocillo) se añadió y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y, para ambos formatos, se añadió solución de sustrato (100 µl/pocillo). El desarrollo del color se detuvo después de 30 minutos a temperatura ambiente con 4H₂SO₄ N (50 µl/pocillo) y la absorbancia se leyó a 450 nm. Las curvas estándar se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros, usando la siguiente fórmula: $Y = [(A - B) / (1 + [x/C]^D)] + B$, donde A representa la absorbancia máxima, B representa la absorbancia mínima, C representa la concentración que produce 50% de la absorbancia máxima y D representa la tangente en un punto de inflexión de la curva sigmoidea.

Así, se obtuvieron los siguientes ELISAs competitivos para la ciprofloxacina:

Tabla 1: Parámetros de ensayos ELISA competitivos para la detección de ciprofloxacina usando agentes inmunorreactivos y anticuerpos desarrollados con agentes inmunorreactivos descritos en esta invención.

As	IR	[IR] µg/mL	[As] Dilución	Abs. Máx	Abs. Mín	IC50 µg/l	Pendiente	R ²
171	116	2,5	1/16000	1,767	0,137	16,40	-0,857	0,9980
171	119	0,0156	1/128000	1,615	0,073	4,81	-0,661	0,9985
171	126	0,25	1/16000	1,360	0,098	1,66	-0,793	0,9691
172	116	2,5	1/4000	1,900	0,090	38,39	-0,770	0,9959
172	119	0,0156	1/32000	1,817	0,088	27,60	-0,646	0,9928
172	126	0,25	1/4000	1,427	0,079	11,56	-0,845	0,9939
173	116	5	1/16000	1,748	0,144	134,68	-0,538	0,9959
173	119	0,0156	1/128000	1,710	0,165	48,55	-0,547	0,9939
173	126	0,25	1/16000	0,915	0,013	1,49	-0,253	0,9825
171	131	0,0625	1/8000	1,49	0,032	0,81	-1,46	0,9952

Determinación de la actividad cruzada

Se prepararon soluciones madre en una concentración de 10 nM para diferentes quinolonas y otros antibióticos en hidróxido sódico (50 nM) y se midieron mediante ELISA. Los valores de reactividad cruzada se calcularon según la ecuación posterior: $(DI_{50} \text{ CPFX} / DI_{50} \text{ de compuestos probados}) \times 100$.

La siguiente tabla muestra valores de IC₅₀ y reactividad cruzada usando agentes inmunorreactivos y anticuerpos desarrollados en esta invención.

ES 2 720 500 T3

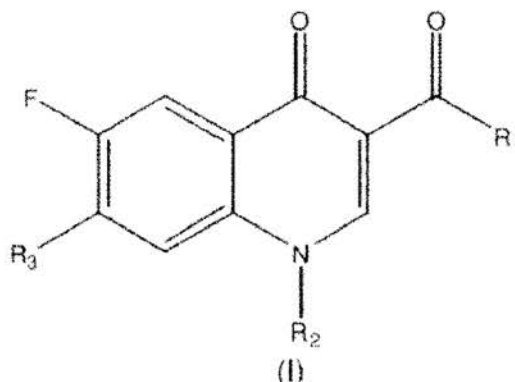
Tabla 2: Datos de IC₅₀ y reactividad cruzada para diversos antibióticos usando 15 anticuerpos desarrollados con agentes inmunorreactivos descritos en la presente.

Compuesto	IC₅₀ (µg-l⁻¹)	%CR
Ciprofloxacina	0,77 ± 0,27	100
Enrofloxacin	0,65	95
Danofloxacin	7,31	8
Difloxacin	0,91	75
Marbofloxacina	4,30	28
Flumequina	3,91	22
Ácido oxolínico	23,53	4
Norfloxacin	0,78	81
Sarafloxacin	0,96	80
Ofloxacin	1,84	39
Sulfametacina	>1000	<0,2
Sulfatiazol	>1000	<0,2
Cloranfénico	>1000	<0,2
Tetraciclina	>1000	<0,2
Doxiciclina	>1000	<0,2
Ampicilina	>1000	<0,2

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) que es opcionalmente un conjugado de una proteína inmunogénica R_4 , seleccionado del grupo que consiste en albúmina sérica bovina (BSA), concanavalina A (CONA), ovoalbúmina (OVA), peroxidasa de rábano picante (HRP), hemocianina de lapa californiana (KLH) y hemocianina de cangrejo herradura (HCH):

5



o sales o solvatos del mismo, en donde:

R_1 se selecciona del grupo que consiste en OH y O-alquilo C_1-C_{10} ;

10 R_2 es $(CH_2)_m-R_5R_6$, m es un valor entre 1 y 6 y R_5 es S y R_6 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6 , arilo, alquil-arilo y R_4 o LR_4 , en donde L es un compuesto de conexión bifuncional;

15 R_3 se selecciona del grupo que consiste en un compuesto heterocíclico, un halógeno y NR_7R_8 , en donde R_7 y R_8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6 y $(CH_2)_n-R_9R_{10}$, en donde n representa un valor de 1 a 6, R_9 se selecciona del grupo que consiste en S, O y NH y R_{10} se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6 , arilo y alquil-arilo,

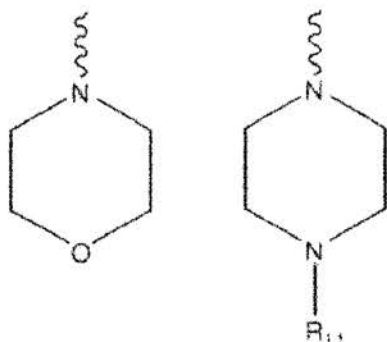
o un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 7-[2-(BSA acetamido)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico; y ácido 7-[2-(4-cloro-6-HRP-1,3,5-triacino-2-ilamino)etilamino]-6-fluoro-4-oxo-1-propil-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico.

20 2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R_1 es O-alquilo C_1-C_6 , preferiblemente O-etilo.

3. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R_5 es S y R_6 es H o LR_4 , siendo L maleimidopropanoato o yodoacetilo.

25 4. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R_3 se selecciona del grupo que consiste en flúor y cloro.

5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R_3 se selecciona del siguiente grupo:



30 en el que R_{11} es alquilo C_1-C_6 o H.

6. El compuesto según la reivindicación 5, en el que R_{11} es metilo.

7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R_3 es NR_7R_8 , siendo R_7 y R_8 grupos alquilo C_1-C_6 respectivos, que pueden ser iguales o diferentes.
- 5 8. El compuesto según la reivindicación 7, en el que R_7 y R_8 son etilo.
9. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R_3 es NR_7R_8 , en donde R_7 es hidrógeno y R_8 un grupo alquilo C_1-C_6 sustituido.
- 10 10. El compuesto según la reivindicación 9, en el que R_3 es $-NH(CH_2)_2NH_2$.
11. Un compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:
- ácido 1-[3-(2-acetamido BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;
 - ácido 1-[3-(2,5-dioxo-1-(3-(BSA carboxamido)propil)pirrolidin-3-iltio)propil]-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;
 - 15 - ácido 1-[3-(2-acetamido HCH)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;
 - ácido 1-[3-(2-acetamido BSA)tiopropil]-6-fluoro-7-(N-piperacinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico;
- y sales o solvatos del mismo.
12. Un compuesto de fórmula (I), según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 - 1-(3-(benzhidriltio)propil)-7-cloro-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxilato de etilo,
- ácido 1-(3-(benzhidriltio)propil)-6,7-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico,
 - ácido 1-(3-(benzhidriltio)propil)-6-fluoro-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico,
 - ácido 1-(3-(benzhidriltio)propil)-6-fluoro-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico,
 - ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-7-(N-morfolinil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico y
 - 25 - ácido 6-fluoro-1-(3-mercaptopropil)-4-oxo-7-(N-piperacinil)-1,4-dihidroquinolino-3-carboxílico.
13. Anticuerpo contra antibióticos de quinolona obtenido mediante inmunización de un animal no humano con un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. El anticuerpo contra antibióticos de quinolona según la reivindicación 13, en el que los antibióticos se seleccionan del grupo que consiste en marbofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, sarafloxacina, ácido oxolínico, flumequina, ofloxacina, danofloxacina y difloxacina.
- 30 15. Un método no terapéutico para obtener anticuerpos contra antibióticos de quinolona, que comprende las etapas de:
- a) activación de una proteína inmunogénica usando un compuesto de conexión bifuncional;
 - b) conjugación de la proteína inmunogénica activada en (a) para obtener un compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12;
 - 35 c) inmunización de un animal no humano con el conjugado obtenido en (b) a fin de inducir la generación de anticuerpos contra quinolona por el animal;
 - d) extracción de los anticuerpos generados en (c).
16. El método no terapéutico según la reivindicación 15, en el que la etapa de activación de proteínas inmunogénicas se efectúa al hacer reaccionar con ésteres succinimidílicos o carbodiimidas.
- 40

17. Un anticuerpo contra antibióticos de quinolona, que se obtiene mediante el método no terapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16.
- 5 18. Uso del anticuerpo según la reivindicación 17, para la detección y/o la cuantificación de antibióticos de quinolona en una muestra biológica aislada.
19. Uso del compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, como agente inmunorreactivo secundario para la detección y/o la cuantificación de antibióticos de quinolona en una muestra biológica aislada.
- 10 20. Uso según la reivindicación 18 o 19, en el que la muestra biológica proviene de un producto de origen animal destinado al consumo alimentario.
21. Uso según la reivindicación 20, en el que el producto de origen animal es leche.
- 15 22. Un estuche para la detección y/o la cuantificación de antibióticos de quinolona que comprende al menos un anticuerpo según la reivindicación 13, 14 o 17 o un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 20 23. Uso del estuche según la reivindicación 22, para la detección y/o la cuantificación de antibióticos de quinolona en productos alimenticios de origen animal.