

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
19 de septiembre de 2013
(19.09.2013)



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/135930 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/65 (2006.01) C07C 237/48 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C07K 16/06 (2006.01)

Barcelona (ES). SÁNCHEZ BAEZA, Francisco; Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC), Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070155

(74) Mandatario: UNGRIA LÓPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
12 de marzo de 2013 (12.03.2013)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201230378 13 de marzo de 2012 (13.03.2012) ES

(71) Solicitante: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

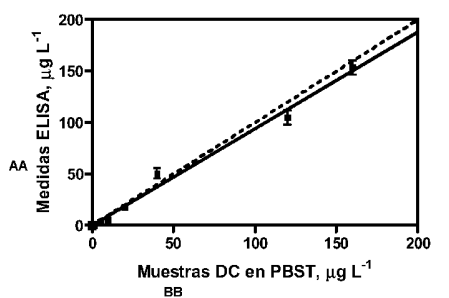
(72) Inventores: MARCO COLÁS, María Pilar; Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC), Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034 Barcelona (ES). ADRIAN IZQUIERDO, Javier; Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC), Jorge Girona Salgado, 18-26, E-08034

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,

[Continúa en la página siguiente]

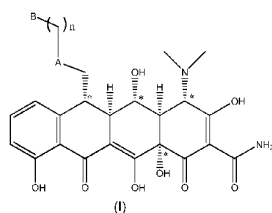
(54) Title: COMPOUNDS DERIVED FROM DOXYCYCLINE SUCH AS HAPTENS, CONJUGATES AND ANTIBODIES THEREOF, AND IMMUNOCHEMICAL METHOD FOR DETECTING DOXYCYCLINE

(54) Título : COMPUESTOS DERIVADOS DE DOXICICLINA COMO HAPTENOS, CONJUGADOS Y ANTICUERPOS DE LOS MISMOS, Y MÉTODO INMUNOQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE DOXICICLINA



(57) Abstract: The present invention relates to compounds having the general formula (I), wherein A is selected from S, O and NH; B is selected from -COOH, -CHO, halogen, -NH₂ and -SH; and n is an integer selected from 1 to 6, to the use thereof as haptens, the conjugates thereof and the use of same for obtaining antibodies, as well as to a method for detecting and/or quantifying doxycycline which uses the antibodies and conjugates of the invention.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I), donde A se selecciona entre S, O y NH; B se selecciona entre -COOH, -CHO, halógeno, -NH₂ y -SH; y n es un entero seleccionado entre 1 y 6, a su uso como haptenos, sus conjugados y el uso de los mismos para la obtención de anticuerpos, así como a un método para la detección y/o cuantificación de doxiciclina que utiliza los anticuerpos y conjugados de la invención.



AA ELISA measurements, µg L⁻¹
BB DC samples in PBST, µg L⁻¹



WO 2013/135930 A1

BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS DERIVADOS DE DOXICICLINA COMO HAPTENOS, CONJUGADOS Y ANTICUERPOS DE LOS MISMOS, Y MÉTODO INMUNOQUÍMICO PARA LA 5 DETECCIÓN DE DOXICICLINA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con compuestos de fórmula general (I), su uso como
10 haptenos, sus conjugados y el uso de los mismos para la obtención de anticuerpos. Asimismo, la invención también se relaciona con un método para la detección y/o cuantificación de doxiciclina que utiliza los anticuerpos y conjugados de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Las tetraciclinas son antibióticos extremadamente populares en medicina humana y veterinaria principalmente para el tratamiento de infecciones bacterianas gastrointestinales, respiratorias y del tracto urinario [1]. Esta familia de antibióticos tiene un amplio espectro de actividad frente a una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas cuando
20 se administra vía oral en el agua o en los alimentos [2]. Pero sólo una pequeña proporción de la dosis de tetraciclinas administrada es metabolizada o absorbida por el organismo, siendo eliminada, en su mayor parte, por heces y orina en su forma inalterada. Esto causa un importante impacto sobre el agua y sobre los organismos que habitan suelos, produciendo efectos adversos sobre el ecosistema.

25

Las tetraciclinas no se encuentran habitualmente a altas concentraciones en el entorno, debido a sus propiedades quelantes, ya que precipitan rápidamente en presencia de cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} o Zn^{2+}) acumulándose en aguas residuales, lodos o sedimentos. Por otra parte, se han detectado residuos de tetraciclinas en la
30 superficie de recursos hídricos que reciben vertidos de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales y de residuos líquidos agrícolas. Además de la persistencia de estos antibióticos en suelos agrícolas que han recibido abonos que contenían antibióticos, la biodegradación de estos compuestos puede conducir a sustancias aún más tóxicas. Por lo tanto, son necesarias nuevas estrategias para mejorar el control de residuos de
35 tetraciclinas y su eficiencia de eliminación en plantas de tratamiento de aguas residuales.

Además, el uso extendido de estos antibióticos junto con su administración irresponsable e inadecuada a la ganadería, tanto para la prevención como para el tratamiento de enfermedades, o bien como aditivo alimentario para promover el crecimiento [3], está aumentando la aparición de resistencias bacterianas que pueden causar un impacto
5 negativo en la salud humana debido a la persistencia de enfermedades que no puedan ser tratadas con los antibióticos conocidos en la actualidad [4]. Además, el consumo de alimentos contaminados con residuos de antibióticos puede causar reacciones alérgicas e interferencias con la flora intestinal, al mismo tiempo que contribuyen a la aparición de poblaciones de bacterias resistentes haciendo que los tratamientos antibióticos no sean
10 efectivos. En el campo de la industria láctea, los residuos de antibióticos causan importantes problemas tecnológicos y pérdidas económicas relacionadas con la inhibición de los procesos de fermentación bacterianos implicados en la elaboración del queso y de otros productos lácteos.

15 Actualmente existe una preocupación por esta situación que hace que los consumidores exijan productos alimentarios más naturales y de mayor calidad. Como resultado, tendencias recientes en la producción, procesamiento y distribución alimentaria están creando una demanda creciente de investigación en seguridad alimentaria con el fin de asegurar el suministro de alimentos más seguros. Una aproximación internacional en la
20 gestión de las resistencias antimicrobianas es esencial para vigilar la seguridad alimentaria de los consumidores. En Europa, el uso de fármacos veterinarios está regulado a través del Reglamento 2377/90/EC y sus anexos, que describen los procedimientos para establecer los límites máximos de residuos [5] para productos médicos veterinarios en productos comestibles de origen animal (por ejemplo, leche, huevos o carne). En particular,
25 Europa ha establecido límites máximos de residuos (LMR) para tetraciclina (TC), clortetraciclina (CTC) y oxitetraciclina (OTC) en muestras lácteas de 100 µg/L. Sin embargo, actualmente no se ha establecido ningún límite máximo de residuos para doxiciclina (DC) o metaciclina (MC) en este tipo de muestras, ya que dichos antibióticos no deberían usarse en animales de granja para la producción de leche [5]. Según la Unidad
30 de Evaluación de Medicina Veterinaria de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales, la DC está indicada en ganado vacuno, cerdos, aves de corral, pavos, perros y gatos para el tratamiento de infecciones, pero no para el uso en ganado vacuno productor de leche ni en gallinas ponedoras. Por otra parte, la FDA estadounidense ha restringido el uso de DC sólo para perros domésticos y nunca debe
35 usarse en animales preñados, de crianza o en crecimiento.

A pesar de esto, existe un riesgo en el uso ilegal o inapropiado de DC, que requiere la disponibilidad de procedimientos analíticos para determinar estos residuos en diversos tejidos. Para ello existen técnicas cromatográficas tales como HPLC-UV y/o HPLC-MS que proporcionan una alta especificidad y una excelente detectabilidad. Sin embargo, dichas técnicas no son adecuadas para un análisis rápido de los residuos o para un cribaje de muchas muestras. Este tipo de técnicas requieren una preparación previa de la muestra, así como un equipamiento sofisticado y un personal de laboratorio experto en la técnica. Alternativamente, se han desarrollado ensayos basados en receptor tales como test con tiras reactivas (es decir, dispositivos de cromatografía de flujo lateral) que son fáciles de usar y se han convertido actualmente en los test de cribado más habituales para tetraciclinas [6,7]. No obstante, las tiras reactivas comerciales disponibles para tetraciclinas son capaces de reconocer a un amplio número de miembros de la familia de tetraciclinas.

Los métodos analíticos inmunoquímicos se han desvelado como métodos que permiten obtener la selectividad y detectabilidad necesaria ofreciendo, al mismo tiempo, la posibilidad de desarrollar una gran variedad de configuraciones analíticas fáciles de usar y de bajo coste que muestran una alta fiabilidad.

Durante los últimos años se han descrito pocos inmunoensayos para tetraciclinas, que utilizan un hapteno de tetraciclina y que permiten su detección en muestras de miel [8,9] y leche [10,11]. Algunos de dichos inmunoensayos han demostrado ser útiles para la determinación del compuesto tetraciclina en muestras de leche. No obstante, dichos ensayos no permiten una detección específica de doxiciclina.

Se ha descrito un hapteno de doxiciclina sintético en cuyo anillo D se ha introducido un brazo espaciador de ácido para-aminobenzoico (PABA) unido a albúmina sérica bovina (BSA) u ovoalbúmina (OVA) que se ha utilizado como inmunógeno para la producción de anticuerpos. Dichos anticuerpos y el conjugado utilizado para producirlos se han empleado en un ensayo ELISA competitivo indirecto para detectar residuos de doxiciclina en tejidos animales comestibles, concretamente en músculo e hígado de cerdo. Dicho método ha demostrado tener un límite de detección de 1,96 µg/l y una sensibilidad $IC_{50} = 8,74$. No obstante, dichos anticuerpos presentan el inconveniente de mostrar reacción cruzada con otros antibióticos de la familia de las tetraciclinas, tales como oxitetraciclina (10,71%) o tetraciclina (4,10%) [12].

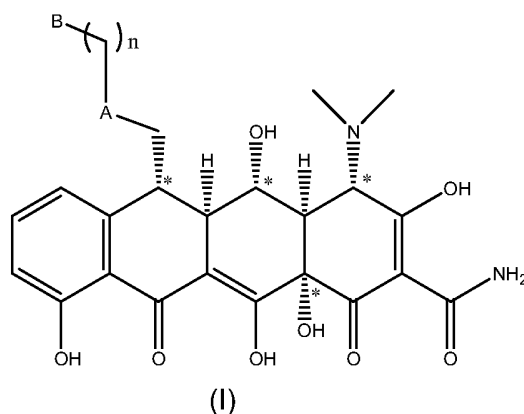
Se conocen 5-hidroxi-6-deoxitetraciclinas sustituidas en la posición 13 por grupos alquiltio y ariltio [13]. Sin embargo, no se ha descrito el uso de estos compuestos como haptenos.

Por tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de proporcionar anticuerpos y ensayos inmunoquímicos que permitan una detección específica de doxiciclina en nuestras
5 alimentarias, clínicas o medioambientales y, más especialmente, en muestras de productos lácteos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

10

En un primer aspecto, la invención se relaciona con el uso del compuesto de fórmula general (I) como hapteno:



15

donde

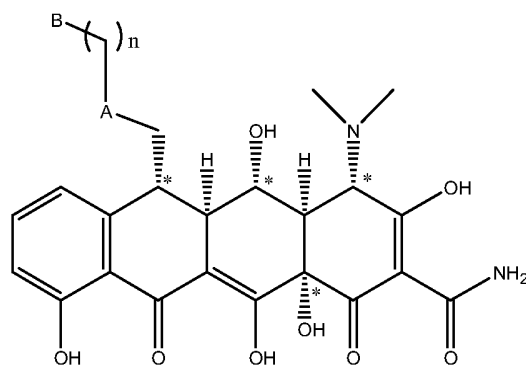
A se selecciona entre S, O y NH;

B se selecciona entre -COOH, -CHO, halógeno, -NH₂ y -SH; y

20 n es un entero seleccionado entre 1 y 6.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un compuesto de fórmula general (I):

5



(I)

5

donde

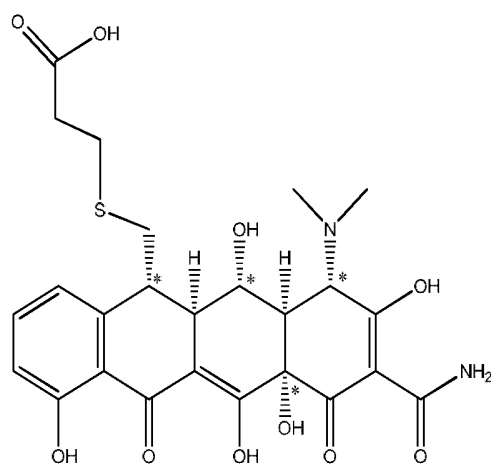
A se selecciona entre S, O y NH;

B se selecciona entre $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, halógeno, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$; y

n es un entero seleccionado entre 1 y 6.

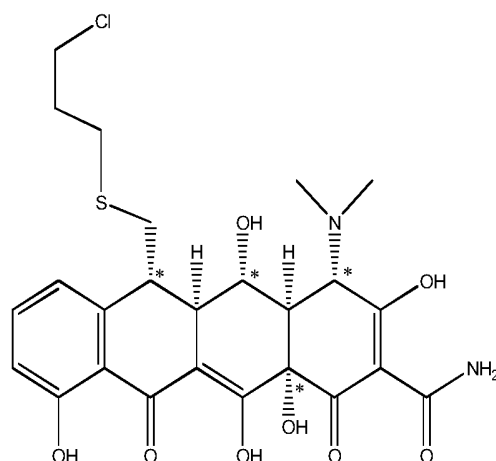
10

con la condición de que dicho compuesto no es



15 ni tampoco es

6



En otro aspecto, la invención se relaciona con un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un segundo componente seleccionado del grupo de:

- 5 (a) una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad,
 (b) un agente de marcaje detectable, y
 (c) un polímero o un soporte inorgánico.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un
10 conjugado según la invención que consiste en crear una unión covalente entre el hapteno
 de fórmula (I) y la proteína, o bien entre el hapteno de fórmula (I) y el agente de marcaje
 detectable, bien sea directamente o a través de un grupo de unión.

Aún en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un conjugado según la
invención para la obtención de anticuerpos.

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo obtenido frente a un
conjugado de la invención o un polipéptido que tenga al menos un fragmento de la
secuencia de dicho anticuerpo con capacidad de unión al antígeno.

20 Aún en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección y/o
 cuantificación de doxiciclina o de un analito derivado de doxiciclina en una muestra que
 comprende el uso de un anticuerpo según la invención o de un fragmento del mismo con
 capacidad de unión al antígeno.

25 En un último aspecto, la invención se relaciona con un kit para la detección y/o
 cuantificación de doxiciclina o de un analito derivado de doxiciclina en una muestra que

comprende al menos un conjugado según la invención y al menos un anticuerpo contra los anticuerpos anti-conjugado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Efecto de diferentes parámetros físico-químicos en el inmunoensayo de As181/TC1-OVA. **A)** Concentración (%) de Tween® 20 en el tampón de ensayo. **B)** Efecto del pH. **C)** Efecto de la fuerza iónica ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). **D)** Efecto de la concentración (mM) de cationes divalentes (Ca^{2+}). Se construyeron curvas de calibración para las diferentes condiciones. Se muestran al menos dos replicados para cada concentración estándar. El eje izquierdo indica el valor de IC_{50} expresado en nM y el ratio $(A_{\text{max}}/\text{IC}_{50}) \times 10$. El eje derecho indica el máximo de absorbancia (A_{max}).

10

Figura 2. Curvas de calibración para el inmunoensayo de As181/TC1-OVA. **A)** Curva de calibración de la respuesta del inmunoensayo optimizado dependiente de la concentración de doxiciclina ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en el tampón PBST **(A)**, en leche sin pre-tratamiento **(B)**, tras precipitación de la proteína con sulfato amónico (indicado en la figura como $\text{H}_2\text{O}+\text{SO}_4$) y a diferentes diluciones de suero lácteo **(C)** y tras precipitación de la proteína en tampón Mc Ilvaine (indicado en la figura como $\text{H}_2\text{O}+\text{Mc}$) y a diferentes diluciones de suero lácteo **(D)**. Para la curva de calibración de doxiciclina preparada en tampón, los datos muestran los promedios de cuatro ensayos realizados en diferentes días. Para el estudio de efecto matriz con muestras de leche tratadas las curvas estándar se prepararon con el suero obtenido. Los datos mostrados son el promedio y desviación estándar de al menos dos pocillos replicados. PBST: tampón fosfato 0,025 M en una solución salina al 2% (343 mmol L^{-1} de NaCl, $6,8 \text{ mmol L}^{-1}$ KCl) con 1 L^{-1} mmol CaCl_2 a pH 5,5 y Tween® 20 al 0,001%.

15
20
25

Figura 3. Estudio de precisión realizado en PBST. El gráfico muestra la correlación entre los valores de concentración de doxiciclina (DC) medidos (eje de ordenadas) y dopados (eje de abscisas) en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ usando el formato ELISA para analizar las muestras de tampón PBST. La línea de puntos corresponde a una correlación perfecta (pendiente = 1). Los datos corresponden al promedio de al menos tres replicados.

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

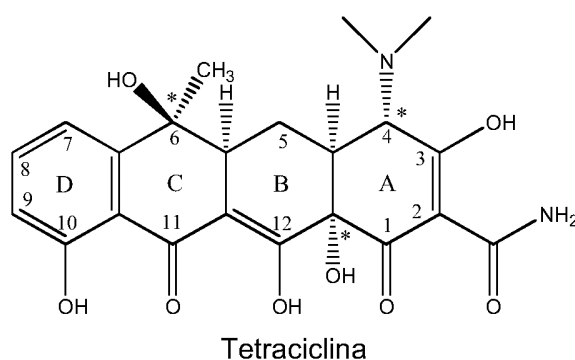
35

Los autores de la presente invención han observado que, de forma sorprendente, la sustitución de un hidrógeno del metilo unido al carbono 6 del anillo C de la doxiciclina por un resto $-A-(CH_2)_n-B$ permite obtener haptenos que, al ser conjugados con una proteína transportadora, son capaces de generar anticuerpos específicos contra doxiciclina que permiten su detección mediante un ensayo inmunoquímico de tipo ELISA mostrando una baja reactividad cruzada con otros antibióticos de la familia de las tetraciclinas, especialmente con oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina. La Tabla 3 de la presente invención demuestra una reactividad cruzada $<1\%$ con dichos antibióticos.

Adicionalmente, el ensayo inmunoquímico de la presente invención muestra un límite de detección más bajo y una mejor sensibilidad que los ensayos inmunoquímicos para la detección de doxiciclina descritos en el estado de la técnica, que han sido realizados con anticuerpos obtenidos frente a un hapteno de doxiciclina cuyo brazo espaciador se halla en el anillo D. Concretamente, los ejemplos de la presente invención demuestran una sensibilidad (IC_{50}) de 1,26 y un límite de detección de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para doxiciclina (Tabla 2).

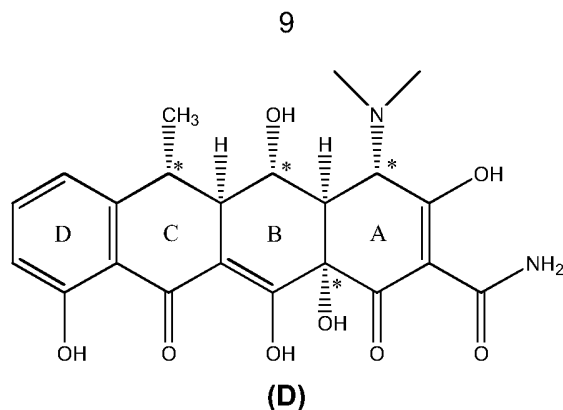
COMPUESTOS DE FÓRMULA (I) Y SU USO COMO HAPTENOS

Las tetraciclinas constituyen un grupo de antibióticos con una actividad antibacteriana de amplio espectro que poseen una estructura molecular tetracíclica. La estructura de la tetraciclina, el compuesto parental de esta familia, se muestra a continuación.



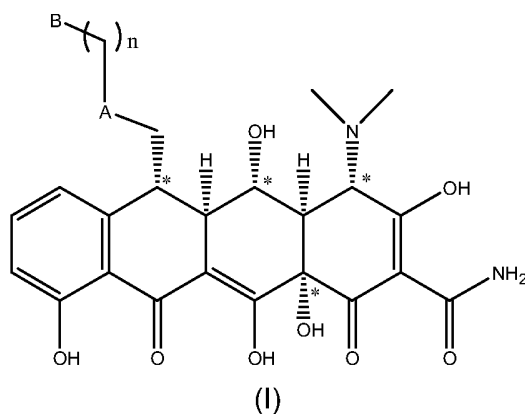
25

La doxiciclina es un antibiótico perteneciente a la familia de las tetraciclinas, cuya fórmula química es **(D)**:



Se han sintetizado compuestos en los que se ha sustituido un hidrógeno del metilo unido al
 5 carbono 6 del anillo C de la doxiciclina por un resto $-A-(CH_2)_n-B$. Los autores de la
 presente invención han demostrado que dichos compuestos pueden ser utilizados como
 haptenos derivados de doxiciclina.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con el uso del compuesto de fórmula
 10 general (I) como hapteno:



15 donde

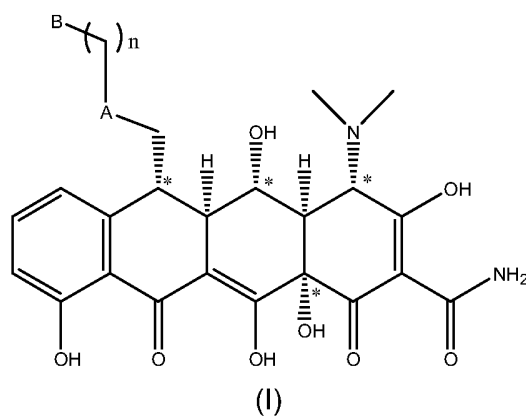
A se selecciona entre S, O y NH;

B se selecciona entre $-COOH$, $-CHO$, halógeno, $-NH_2$ y $-SH$; y

n es un entero seleccionado entre 1 y 6.

20 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un compuesto de fórmula general (I):

10



donde

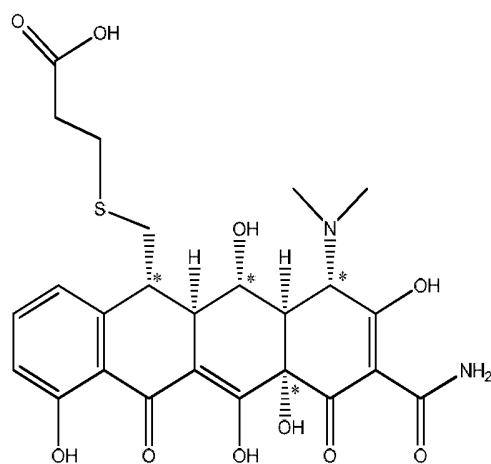
5 A se selecciona entre S, O y NH;

B se selecciona entre $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, halógeno, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$; y

n es un entero seleccionado entre 1 y 6.

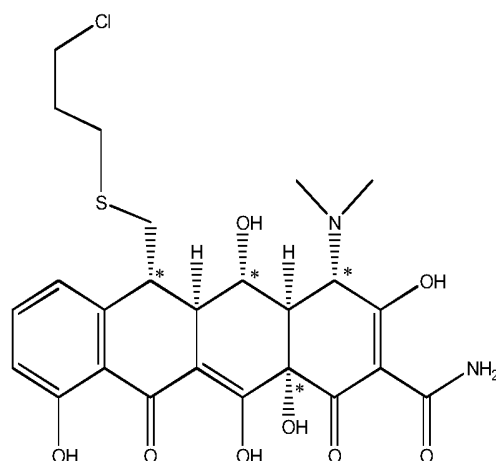
con la condición de que dicho compuesto no es

10



ni tampoco es

11



El compuesto de doxiciclina está unido al brazo espaciador a través de A. En una realización de la invención A es O. En otra realización de la invención A es NH. En una
5 realización preferida de la invención A es S.

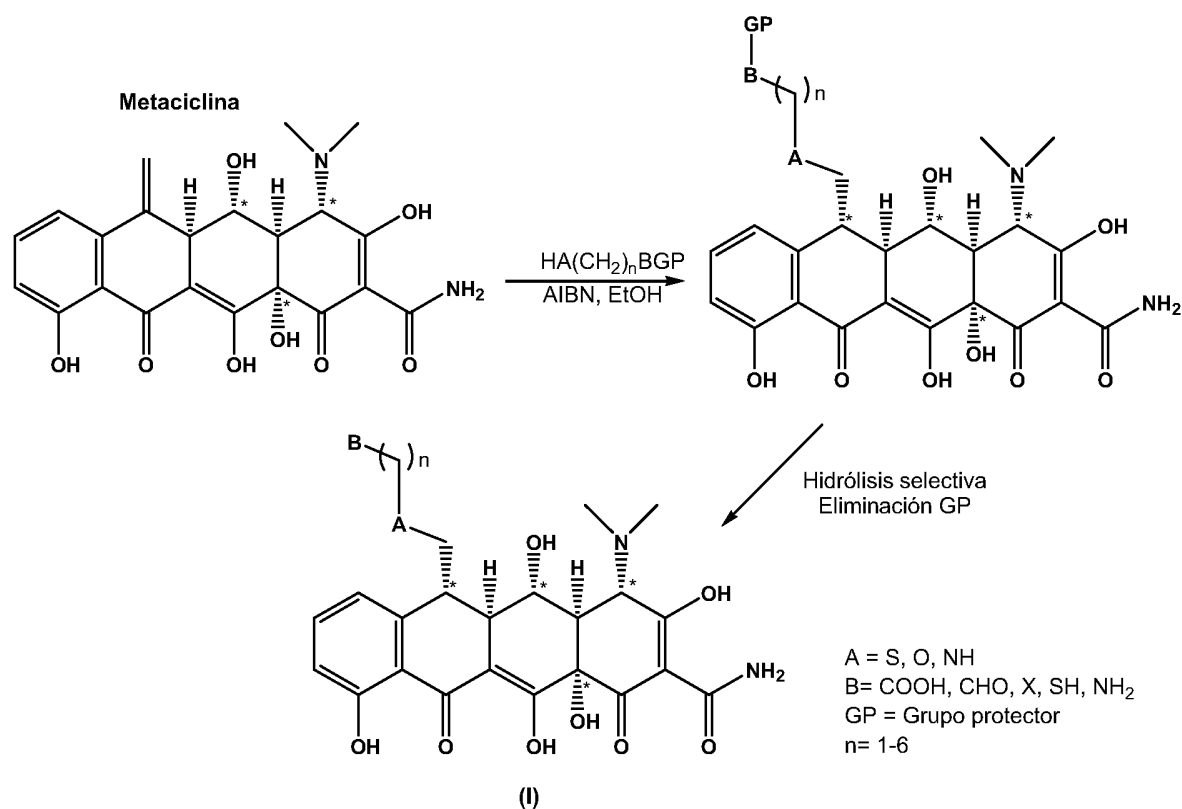
En la parte distal del brazo espaciador se encuentra B. En el contexto de la presente invención B se selecciona entre $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, halógeno, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$. En una realización preferida B es $-\text{COOH}$.
10

El término "halógeno" se refiere a un átomo de F, Cl, Br o I. Preferiblemente, el halógeno es cloro o bromo.

A y B están separados por una cadena de 1 a 6 metilenos ($n = 1-6$), preferiblemente entre 1 y 4 metilenos, más preferiblemente entre 1 y 2 metilenos, lo más preferiblemente 1 metileno.
15

Los compuestos de fórmula general (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, en particular pueden sintetizarse a partir de metaciclina, otro antibiótico perteneciente a la familia de las tetraciclinas, mediante el siguiente procedimiento sintético:
20

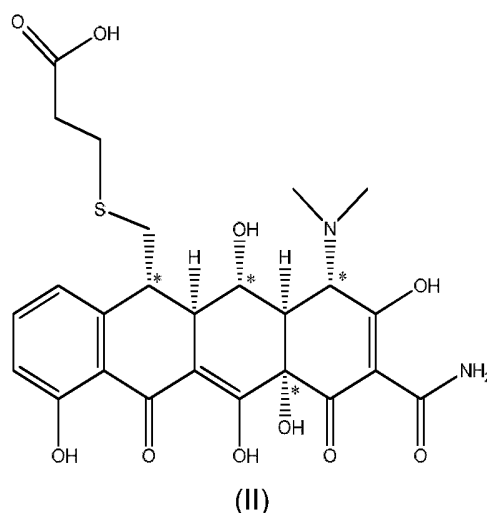
12



En una primera etapa se produce una adición radicalaria anti-Markovnikov del brazo espaciador $\text{HA(CH}_2)_n\text{BGP}$ (donde A, B y n son según se ha definido anteriormente, y donde el grupo B se halla protegido por un grupo protector GP) al doble enlace del carbono 6 exocíclico de la metaciclina. Para ello se utiliza una cantidad catalítica de azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador radicalario en etanol. Grupos protectores adecuados para este fin son, sin limitación, de tipo ester, acetal, carbamato, disulfuro, tioéter, etc. Tras la adición radicalaria, la obtención del compuesto intermedio se realiza según se describe en el apartado de Material y Métodos de la presente memoria descriptiva.

En una segunda etapa, sobre el compuesto intermedio obtenido en la etapa anterior se realiza una hidrólisis selectiva para eliminar el grupo protector y obtener el compuesto de fórmula general (I). Las condiciones de esta hidrólisis selectiva son las habituales mediante catálisis ácida para los grupos ester, acetal, tioéter o carbamato y alcalino para los grupos ester y reductora para el disulfuro. No obstante, cabe indicar que cuando el grupo B es un halógeno (X) la reacción se realiza en una única etapa, sin el uso de un grupo protector y, por lo tanto, sin obtenerse el compuesto intermedio previamente mencionado.

En una realización preferida de la invención el compuesto sintetizado es 13-[(2-carboxietil)tio]-5-hidroxi-6- α -desoxitetraciclina, también conocido como (ácido 3-(((4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-2-carbamoil-4-(dimetilamino)-3,5,10,12,12a-pentahidroxi-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidrotetracen-6-il)metiltio)propanoico según nomenclatura IUPAC), de fórmula (II):



- 10 Dicho compuesto, también denominado TC1 en la sección de ejemplos de la presente memoria descriptiva, se sintetiza por el método previamente descrito. Un esquema de síntesis y una descripción detallada de la misma pueden encontrarse en la sección de Material y Métodos de la memoria descriptiva de la presente invención.
- 15 Los autores de la presente invención han observado que los compuestos derivados de doxiciclina de fórmula general (I) y, más concretamente, el compuesto de fórmula (II), pueden utilizarse como haptenos para obtener inmunoreactivos mediante conjugación con otro compuesto.
- 20 En el contexto de la presente invención, el término “hapteno” se refiere a un compuesto químico con una masa molecular inferior a 10.000 Daltons que no es capaz de inducir por sí mismo la formación de anticuerpos en un organismo animal, y que requiere de la unión covalente a una proteína transportadora para estimular una respuesta inmunitaria. Concretamente, el hapteno de la presente invención es un análogo estructural de la
- 25 doxiciclina.

CONJUGADOS DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención, han obtenido conjugados de los haptenos de la invención con proteínas transportadoras, con agentes de marcaje detectables o con
5 polímeros o soportes inorgánicos.

Por tanto, otro aspecto de la invención es un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un segundo componente seleccionado del grupo de:

- (a) una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad,
- 10 (b) un agente de marcaje detectable, y
- (c) un polímero o un soporte inorgánico.

En el contexto de la presente invención, por “conjugado” se entiende el complejo formado por la unión covalente de un hapteno de doxiciclina de fórmula general (I) y un segundo
15 componente seleccionado de una proteína transportadora, un agente de marcaje detectable, un polímero y un soporte inorgánico.

La expresión “proteína transportadora que confiere antigenicidad” se refiere a una molécula de elevada masa molecular (más de 10 kDa) que al conjugarse a un hapteno actúa como
20 transportador de dicho hapteno y en un organismo animal se convierte en un inmunógeno capaz de inducir la formación de anticuerpos contra dicho hapteno. En dicho conjugado el hapteno es el responsable de inducir la especificidad deseada en la respuesta inmune, y la molécula transportadora es la responsable de conferir antigenicidad al hapteno, esto es, la capacidad de comportarse como un antígeno. También puede utilizarse un fragmento de
25 dicha proteína, incluyendo polipéptidos sintéticos o semisintéticos. En una realización preferida el segundo componente es una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad, preferiblemente una proteína transportadora.

El conjugado de la invención formado por un hapteno de fórmula (I) y una proteína
30 transportadora se denomina antígeno si el objetivo de dicho conjugado es unirse a los anticuerpos específicos contra doxiciclina. Por otra parte, cuando el conjugado de la invención se utiliza para desencadenar una respuesta inmunológica en un organismo animal, dicho conjugado se denomina inmunógeno.

Las proteínas útiles como moléculas transportadoras para esta invención son proteínas con una masa molecular superior a 10 kDa, preferiblemente superior a 15 kDa. Cuando los conjugados de la invención se utilizan para inmunizar un animal, dichas proteínas deben proceder de una especie animal distinta de la especie que se desea inmunizar. Entre las proteínas útiles se incluyen, sin limitación, seroalbúminas de varias especies, por ejemplo 5 bovina (BSA), de conejo (RSA); hemocianinas de molusco, por ejemplo la hemocianina de cangrejo (HCH) o la hemocianina de lapa (KLH); ovoalbúmina (OVA), conalbúmina (CONA), tiroglobulina, fibrinógeno, etc. En una realización preferida la proteína transportadora es una proteína seleccionada del grupo consistente en hemocianina de 10 molusco (HCH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina (OVA) y conalbúmina (CONA), más preferiblemente de BSA, OVA y CONA. En una realización aún más preferida la proteína es HCH.

La invención también contempla el uso de fragmentos de dichas proteínas transportadoras. 15 Cuando el conjugado entre el hapteno y un fragmento de una proteína transportadora vaya a utilizarse para inmunización, el fragmento de proteína debe tener una masa molecular lo suficientemente elevada para que le permita conservar su capacidad para conferir inmunogenicidad al hapteno.

20 En una realización preferida de la invención el conjugado comprende un hapteno de fórmula (II) y una molécula transportadora seleccionada de BSA, OVA y CONA, preferiblemente OVA. En otra realización preferida de la invención el conjugado comprende un hapteno de fórmula (II) y la molécula transportadora es HCH.

25 En otra realización de la invención, el conjugado comprende un hapteno de fórmula general (I) y un agente de marcaje detectable.

En el contexto de la presente invención, por "agente de marcaje detectable" se entiende un compuesto capaz de reaccionar con algún sustrato, de forma que se derive de ello una 30 detección cromogénica, fluorogénica y/o quimioluminiscente. Este compuesto puede unirse al hapteno directamente o a través de otro componente. En una realización preferida el agente de marcaje detectable se selecciona de una enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, una sustancia fluorófora, nanopartículas o una mezcla de las mismas.

A modo ilustrativo, no limitativo, ejemplos de enzimas pueden ser peroxidasa, glicosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, luciferasa, etc. Ejemplos no limitativos de sustancias (químico)luminiscentes son dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio, luminol, etc. Ejemplos, no limitativos, de sustancias radioactivas son azufre, yodo, etc., específicamente radioisótopos o radionúclidos que pueden incluir, sin limitación, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I . Ejemplos no limitativos de compuestos fluorescentes o fluoróforos pueden ser fluoresceína, rodamina, fósforos lantánidos, FITC, etc. El agente de marcaje detectable también puede ser una nanopartícula y otros tipos de marcadores particulados (látex, oro, puntos cuánticos), complejos metálicos (Tb^{3+} , Eu^{3+}), cofactores enzimáticos (FAD), etc.

En una realización preferida la sustancia luminiscente se selecciona de una sustancia bioluminiscente, una sustancia quimioluminiscente y una sustancia fluorescente.

En otra realización preferida el agente de marcaje detectable es una enzima, preferiblemente es la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Todavía más preferido es un conjugado entre el hapteno de fórmula (II) y HRP.

En otra realización de la invención, el conjugado comprende un hapteno de fórmula general (I) y un polímero.

El término "polímero", según se usa en este documento, se refiere a una macromolécula formada por la unión de una cantidad finita de moléculas más pequeñas llamadas monómeros, que le confieren un alto peso molecular. Ejemplos de polímeros útiles en la presente invención son, sin limitarse a, dextrano simple o modificado, polipirrol, polianilina o polilisina.

En otra realización de la invención, el conjugado comprende un hapteno de fórmula general (I) y un soporte inorgánico. Por "soporte inorgánico", en el contexto de la presente invención, se entiende el material de la superficie de un dispositivo inmunosensor o de partículas que se utilicen para un inmunoensayo. Típicamente estos soportes inorgánicos pueden ser óxido de silicio (vidrio) ya sea planar o en partículas, óxidos metálicos como el óxido de aluminio, óxido de tantalio, etc, metales nobles como el oro ya sea en forma planar o en nanopartículas, etc.

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LOS CONJUGADOS DE LA INVENCIÓN

Otro aspecto de la invención es un método para la obtención de un conjugado según la invención que consiste en someter el hapteno y el segundo componente del conjugado a un método de conjugación.

En los conjugados de la invención entre un hapteno y una proteína, las proteínas se unen al hapteno de forma covalente por medio de los aminoácidos accesibles en su superficie, preferiblemente aquellos aminoácidos con cadenas laterales de tipo nucleófilo. El aminoácido reactivo de las proteínas se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse a, cisteína, serina, tirosina y lisina; preferiblemente es lisina.

La unión de los haptenos a las proteínas, generalmente ocurre por los grupos más reactivos de las proteínas: ϵ - y α -amino, fenólico, sulfhidrilo, imidazólico y carboxilo. Los procedimientos para lograr la conjugación de haptenos a otras moléculas portadoras dependen del grupo funcional presente en la molécula de hapteno en cuestión. También hay que tener en cuenta la estabilidad y la solubilidad del hapteno. Por lo tanto, dada la gran variedad de haptenos que existen, no hay un método común de conjugación.

El hapteno de fórmula (I) de la invención se conjuga a la proteína a través de su grupo B. Cuando el grupo B del hapteno es un ácido carboxilo (-COOH), para la conjugación puede utilizarse, entre otros, el método del anhídrido mixto, el método de la carbodiimida (CDI) o el método del éster-N-hidroxisuccinimida (NHS) (este último también conocido como método del éster activo).

Cuando el grupo B del hapteno es un aldehído (CHO), este puede ser transformado en grupo carboxilo mediante la formación de O-(carboximetil)oximas. La reacción se efectúa tratando el hapteno con O-(carboximetil)hidroxilamina. La reacción del ácido carboxílico formado con la proteína se continúa por uno de los métodos antes mencionados. Los haptenos que presentan grupos formilo también pueden ser acoplados directamente a través de la formación de las bases de Schiff, que son transformadas a aminas por reducción con borohidruro de sodio.

Cuando el grupo B del hapteno es un halógeno la conjugación se realiza sobre una proteína o péptido previamente modificado de forma que tenga grupos tiol reactivos. Un

ejemplo supone hacer reaccionar la proteína seleccionada con cisteína mediante formación de enlaces amida tanto con el grupo ácido como el grupo amino. O introducir grupos tiol mediante reacción de un amino-tiol como la cisteamina.

- 5 Cuando el grupo B del hapteno es un grupo sulfhidrilo o mercapto (SH), el hapteno se conjuga a proteínas con maleimididas, o bien por activación de las proteínas con bromoacetamida, o por formación de puentes disulfuro entre la proteína portadora y el hapteno en tampón acetato pH 4,0 en presencia de peróxido de hidrógeno.
- 10 Cuando el grupo B del hapteno es un grupo amino reducible, el grupo amino alifático puede ser conjugado a las proteínas por algunos de los métodos anteriormente mencionados para los ácidos carboxílicos, o bien por conversión de la amina alifática en amina aromática por tratamiento con cloruro de p-nitrobenzoilo y posterior reducción a la p-aminobenzolamida, cuyo producto es después convertido a la correspondiente sal de
- 15 diazonio por reacción de diazotación y, posteriormente, se lleva a cabo la conjugación con la proteína a pH 9.

Todos estos métodos de conjugación son bien conocidos del estado de la técnica y se describen de modo resumido en (Guerra M., Morris H. 2003. Revista Cubana de Química, vol. XV, nº 2) y de forma más extensa en (Bartos E., Practice and Theory of Enzyme

20 Immunoassays, Barcelona, 1988, págs. 279-296). Dichos métodos se muestran aquí a título orientativo y no en sentido limitativo, ya que pueden emplearse otros métodos de conjugación conocidos por el experto en la materia.

25 Todos estos métodos de conjugación también son útiles para la síntesis de conjugados entre un hapteno y un agente de marcaje detectable. Los métodos utilizados para la conjugación entre un hapteno y un agente de marcaje son conocidos del estado de la técnica. Como el experto en la materia apreciará, para llevar a cabo esta reacción es necesario que el agente de marcaje posea un grupo funcional libre, preferiblemente un

30 grupo funcional carboxilo, aldehído, halógeno, sulfhidrilo o amino.

Por lo tanto, en otro aspecto la invención se refiere a un método para la obtención de un conjugado según la invención que consiste en crear una unión covalente entre el hapteno de fórmula (I) y la proteína, o bien entre el hapteno de fórmula (I) y el agente de marcaje

detectable, o bien entre el hapteno de fórmula (I) y el polímero o soporte inorgánico, bien sea directamente o a través de un grupo de unión.

Por "unión covalente", en el contexto de la presente invención, se entiende una unión entre
5 átomos efectuada mediante un enlace covalente, en el que se comparten electrones entre dos o más átomos. Dicha unión puede efectuarse directamente (cuando el enlace une los dos grupos funcionales que han reaccionado) o bien a través de un grupo de unión. Por "grupo de unión" se entiende cualquier átomo del producto final de conjugación situado
10 entre los dos grupos funcionales que han reaccionado y que no se hallaba previamente en el hapteno ni en la proteína o agente de marcaje detectable.

En una realización preferida de la invención, la unión covalente se realiza mediante un método de conjugación seleccionado del grupo consistente en el método del anhídrido mixto, el método del éster activo, la conjugación mediante halógenos y la conjugación
15 mediante un aldehído, preferiblemente es un método seleccionado del método del anhídrido mixto y el método del éster activo.

Todas las realizaciones específicas mencionadas en el contexto de los conjugados de la invención son de aplicación también en este aspecto inventivo.

20

Aunque la conjugación entre un hapteno y una proteína puede realizarse por diferentes métodos, es recomendable utilizar aquel con el que se obtenga un mayor porcentaje de conjugación. La tabla 1 de la parte experimental de este documento muestra que el método más adecuado para la conjugación entre un hapteno de fórmula (II) y la proteína transportadora BSA es el método del éster activo, que da un porcentaje de conjugación del
25 31-36% frente al método del anhídrido mixto (9-11%).

En una realización preferida el hapteno es el compuesto de fórmula (II). En una realización aún más preferida cuando el conjugado se forma entre el compuesto de fórmula (II) y la
30 proteína transportadora HCH, el método de conjugación utilizado es el método del anhídrido mixto [14]. En otra realización preferida cuando el conjugado se forma entre el compuesto de fórmula (II) y una proteína transportadora seleccionada de BSA, OVA y CONA, o el agente de marcaje detectable HRP el método utilizado es el método del éster activo [15].

35

La conjugación entre un hapteno de fórmula (I) y un polímero o un soporte inorgánico puede realizarse utilizando los mismos procedimientos que para la conjugación a proteínas o péptidos ya sea directamente si tienen grupos funcionales libres o mediante una modificación de los mismos que introduzca un grupo funcional reactivo. Clásicamente, para los soportes inorgánicos, esto se ha realizado para óxido de silicio y de otros metales mediante silanos heterobifuncionales o mediante tioles funcionalizados (para superficies de metales nobles). Mientras que para los polímeros se utilizan directamente aquellos que ya poseen grupos funcionales activos procedentes de su formulación de base.

10 USOS DE LOS CONJUGADOS DE LA INVENCION PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPOS

Es otro aspecto de la invención el uso de un conjugado que comprende un hapteno de fórmula general (I) y una proteína transportadora que confiere antigenicidad para la obtención de anticuerpos.

El término "anticuerpo", según se usa en la presente invención, se refiere a una proteína monomérica o multimérica que comprende al menos un polipéptido que tiene capacidad de unirse a doxiciclina y que comprende la totalidad o parte de la región variable de la cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina. El término anticuerpo incluye a cualquier tipo de anticuerpo conocido, tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. En el contexto de esta invención el término anticuerpo se refiere a la inmunoglobulina que el animal o una célula híbrida ha sintetizado de forma específica contra el hapteno de doxiciclina conjugado.

En una realización preferida los anticuerpos son anticuerpos policlonales. En la presente invención, por "anticuerpos policlonales" se entienden anticuerpos derivados de diferentes líneas de células B, es decir, anticuerpos que son una mezcla de inmunoglobulinas, secretadas en contra de doxiciclina, cada una de las cuales reconoce a diferentes epítomos.

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra un hapteno de fórmula (I) se inmuniza un animal no humano con un conjugado de la invención que comprende dicho hapteno y una molécula transportadora que confiere antigenicidad según métodos conocidos por el experto en la técnica [15]. Una vez obtenido un título de anticuerpos aceptable, el animal es exanguinado y se recoge el antisero que contiene los anticuerpos séricos formados por

dicho animal. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención la obtención de anticuerpos comprende la administración de un conjugado según la invención y la recolección del antisuero que contiene los anticuerpos séricos resultantes del animal inmunizado. Brevemente, el procedimiento para obtener anticuerpos policlonales se describe en los
5 ejemplos.

El término “antisuero” se refiere al suero que se obtiene de la sangre de un animal que contiene una mezcla de anticuerpos que han sido sintetizados como consecuencia del ingreso del hapteno conjugado en el cuerpo del animal. Dicho antisuero puede utilizarse
10 directamente o bien los anticuerpos séricos que contiene pueden purificarse por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína A-sepharosa, etc.

Por “animal inmunizado” se entiende un animal no humano en el que se ha inyectado el conjugado y en el que se han generado los anticuerpos. Dicho animal puede ser, sin
15 sentido limitativo, conejo, ratón, cabra, oveja, gallina; preferentemente es un conejo.

En otra realización los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Por “anticuerpos monoclonales” se entienden anticuerpos homogéneos idénticos producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única
20 célula madre y una célula plasmática tumoral.

El procedimiento de obtención de los anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse según métodos convencionales, conocidos en el estado de la técnica. Básicamente, el método consiste en inmunizar un animal con un conjugado según la
25 invención que comprende un hapteno de fórmula (I) y una molécula transportadora que confiere inmunogenicidad, y posteriormente extraer células del bazo del animal inmunizado, que se fusionan con células de mieloma en presencia de un inductor de la fusión, tal como PEG-1500 por procedimientos estándar (Harlow D y Lane D. Antibodies: a laboratory manual. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New
30 York). Los hibridomas se seleccionan y se subclonan por dilución. Los clones aptos para su expansión se constituyen en una línea celular de hibridoma. A continuación, dicha línea celular de hibridoma se cultiva en un medio de cultivo adecuado para que las células de hibridoma produzcan anticuerpos y los secreten al medio, y se recoge posteriormente el sobrenadante del medio de cultivo que contiene los anticuerpos monoclonales producidos.
35 Opcionalmente, dichos anticuerpos pueden purificarse por medios convencionales, tales

como cromatografía de afinidad, proteína A-Sepharosa, cromatografía con hidroxapatito, electroforesis en gel o diálisis. Por lo tanto, en una realización de la invención la obtención de anticuerpos comprende la administración de un conjugado según la invención y la recolección de células tisulares de dicho animal capaces de producir dichos anticuerpos.

5

La expresión “células tisulares de dicho animal capaces de producir dichos anticuerpos” se refiere a los linfocitos presentes en la estructura del bazo del animal inmunizado o en otro órgano rico en células del sistema inmune como pueden ser los ganglios linfáticos.

10 En una realización preferida el conjugado de la invención utilizado para la producción de anticuerpos es un hapteno de fórmula (I), preferentemente un hapteno de fórmula (II), conjugado con HCH.

ANTICUERPOS DE LA INVENCIÓN

15

En un aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo obtenido frente a un conjugado de la invención o un polipéptido que tenga al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo con capacidad de unión al antígeno.

20 El término “anticuerpo”, según se usa en este documento, se refiere a una inmunoglobulina que muestra una actividad de unión específica hacia una molécula objetivo o antígeno, que en este caso es el antibiótico doxiciclina. En una realización preferida el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización preferida el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Dicho anticuerpo policlonal puede estar purificado y libre de restos de componentes del suero
25 o contenido en un antisuero.

En el presente documento el “antígeno” es la molécula a la que se une específicamente un anticuerpo. Concretamente, para los anticuerpos de la invención el antígeno es la doxiciclina.

30 El término “conjugado” en el contexto de este aspecto inventivo se refiere a un conjugado entre un hapteno de fórmula (I) y una proteína transportadora capaz de conferir antigenicidad al hapteno. Quedan por tanto excluidos del ámbito del presente aspecto inventivo los conjugados entre un hapteno de fórmula (I) y un agente de marcaje detectable. En realizaciones de la invención el anticuerpo de la invención se ha obtenido frente a cualquier
35 conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y una molécula transportadora que

confiere antigenicidad, preferiblemente frente a un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (II) y la molécula transportadora HCH.

5 La invención contempla también polipéptidos que tengan al menos un fragmento de la secuencia de los anticuerpos específicos anti-doxiciclina de la invención que mantengan la capacidad de unión a doxiciclina. Dicha capacidad de unión puede comprobarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia, tales como ELISA o Western blot.

10 Por "polipéptidos" se entienden moléculas formadas por la unión de al menos 10 aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos de la invención deben tener al menos un fragmento de la secuencia de los anticuerpos específicos anti-doxiciclina mencionados. Dicho "fragmento de la secuencia" puede corresponder a una o varias porciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mencionado que mantiene la capacidad de unión a doxiciclina, y por lo tanto, el polipéptido debe incluir la secuencia de las 6 regiones CDR. Dicho "fragmento de la secuencia" puede utilizarse para la obtención de fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos o nanobodies.

15 Los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden obtenerse mediante escisión enzimática o química de los anticuerpos intactos de la invención.

20 La digestión con papaína de un anticuerpo de la invención produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno. Por su parte, el fragmento "F(ab')₂", que tiene dos sitios de unión al antígeno, se obtiene por tratamiento con pepsina.

25 Adicionalmente, el "fragmento de la secuencia" permite obtener otro tipo de fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab', fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o diacuerpos mediante técnicas de ingeniería genética. La obtención de tales fragmentos puede realizarse según métodos conocidos por el experto en la materia y descritos en el estado de la técnica.

30 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

35

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión al antígeno y de reconocimiento del antígeno. Esta región consiste en un dominio variable en dímero de una cadena pesada y una cadena ligera variable en una fuerte asociación no covalente. Es en esta configuración en la que interactúan las tres regiones hipervariables de cada dominio variable para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo la especificidad antígeno-anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv, que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpos “Fv de cadena sencilla” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un polipéptido conector entre los dominios VH y VL que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los scFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, N.Y., págs. 269-315 (1994).

El término “nanobodies” designa a entidades de pequeño tamaño (15 kDa) formadas únicamente por la región de unión al antígeno de la cadena pesada (fragmento VH) de las inmunoglobulinas. Dichos nanobodies se producen, principalmente, tras la inmunización de animales de la familia de los camélidos, tales como camellos, llamas y dromedarios, principalmente llamas; y también de tiburones, que tienen la particularidad de poseer anticuerpos que carecen de cadena ligera de forma natural y que reconocen al antígeno por el dominio variable de la cadena pesada. Los nanobodies presentan ventajas como la reducción de costes de producción con respecto a los anticuerpos completos, la estabilidad y la reducción de inmunogenicidad.

Los fragmentos de anticuerpos incluidos en la presente invención conservan la capacidad de unión al antígeno doxiciclina del anticuerpo completo del que proceden y deben, por tanto, unirse específicamente a doxiciclina. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “se une específicamente a” se refiere a la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a la doxiciclina y no a otros antibióticos de la misma familia de tetraciclinas.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para la detección, cuantificación o aislamiento de doxiciclina. Para ello dichos anticuerpos pueden estar inmovilizados en un soporte sólido. Por lo tanto, en una realización de la invención el anticuerpo de la invención
5 está inmovilizado en un soporte sólido.

Por “inmovilizado en un soporte sólido”, tal como se entiende en la presente invención, significa que el anticuerpo está unido a un soporte que puede ser, sin limitarse a, una resina de intercambio iónico o adsorción, vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres de celulosa,
10 esferas paramagnéticas o la combinación de algunos de ellos. Preferiblemente el material de soporte sólido es plástico y el soporte son placas para análisis ELISA.

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y/O CUANTIFICACIÓN DE DOXICICLINA DE LA INVENCIÓN

15

Los inventores han desarrollado un método que permite detectar y/o cuantificar los residuos de doxiciclina en cualquier tipo de muestra mediante el uso de los anticuerpos y conjugados de la invención.

20 Por tanto, en otro aspecto la invención se relaciona con un método para la detección y/o cuantificación de doxiciclina o de un analito derivado de doxiciclina en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo según la invención o de un fragmento del mismo con capacidad de unión al antígeno.

25 El método de la invención permite no sólo detectar la presencia de doxiciclina en una muestra, sino también valorar la concentración de doxiciclina presente en dicha muestra.

Por “doxiciclina” se entiende el antibiótico representado por la fórmula química **(D)**. Por “analito derivado de doxiciclina” se entiende un compuesto químico que mantiene la parte
30 de la estructura química de doxiciclina responsable de su reconocimiento específico por parte de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, un analito derivado de doxiciclina es la doxiciclina inactivada por la formación de quelatos, según puede encontrarse en un organismo animal. También son analitos derivados de doxiciclina aquellos productos de la degradación de doxiciclina que puedan hallarse en muestras medioambientales o en
35 piensos medicados para la alimentación de animales. El término “analito derivado de

doxiciclina” excluye a otros antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas distintos de doxiciclina. En una realización particular el “analito derivado de doxiciclina” es un quelato de doxiciclina y metales tales como calcio, magnesio, hierro y aluminio.

5 El término “muestra”, según se usa en el presente documento, se refiere a la muestra a analizar por el método de la invención para determinar si dicha muestra contiene doxiciclina o un analito derivado de la misma. Cualquier tipo de muestra puede analizarse según el método de la invención. Así, se contempla el análisis de muestras biológicas tanto animales como humanas, ya sea con finalidad clínica (por ejemplo, para determinar la
10 concentración de doxiciclina presente en muestras sanguíneas y establecer una eficacia terapéutica) o para el análisis de residuos en muestras biológicas animales para uso alimentario. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de muestras biológicas incluyen tanto muestras de tejidos como de fluidos corporales susceptibles de contener doxiciclina (por ejemplo, sangre, suero, plasma, leche, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, exudados
15 tisulares, etc.). La muestra de ensayo puede ser una muestra de origen animal sospechosa de contener doxiciclina, tal como, por ejemplo, leche o carne de vacuno; pero también puede ser una muestra de origen vegetal, tal como frutas y verduras. En una realización particular, dicha muestra es una muestra de tejido o fluido de ganado bovino, caprino, equino, ovino, porcino, etc. o una muestra de un ser humano. También se contempla en el
20 ámbito de la presente invención el análisis de muestras medioambientales tales como, sin limitación, agua, suelos o fangos de depuradora para determinar una posible contaminación por doxiciclina. Por tanto, en una realización la muestra a analizar se selecciona de una muestra alimentaria, clínica y medioambiental. En una realización particular de la invención la muestra es medioambiental, preferiblemente seleccionada de
25 agua, suelo y fangos de depuradora. El método de la presente invención puede utilizarse también para el análisis de piensos medicados destinados a la alimentación de animales.

El análisis de tejidos animales tiene interés sobre todo en aquellos tejidos destinados al consumo humano en los que se ha estipulado un límite máximo de residuos (LMR) de
30 doxiciclina permitido. Por ejemplo, según el Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo de 26 de Junio de 1990, los LMR para doxiciclina en músculo, hígado y riñón de bovinos, porcinos y aves son de 100 µg/kg, 300 µg/kg y 600 µg/kg en cada tejido, respectivamente. En piel más grasa de porcinos y aves el LMR para doxiciclina es de 300 µg/kg. Los métodos de la invención son particularmente útiles para el análisis de dichas muestras.

Otros tejidos o fluidos para el consumo humano para los que no se ha estipulado un LMR también pueden analizarse mediante el método de la invención.

5 En general, la muestra de ensayo se obtendrá por métodos convencionales, conocidos por los técnicos en la materia, dependiendo de la naturaleza de la muestra. Antes de iniciar el ensayo, la muestra puede ser sometida (o no) a un tratamiento previo, precipitada, fraccionada, separada, diluida, concentrada o purificada. En una realización preferida la muestra se homogeneiza, extrae y seca.

10 En una realización aún más preferida la muestra es alimentaria, preferiblemente es un alimento de origen animal, más preferiblemente es leche.

15 El método de la invención requiere necesariamente el uso de un anticuerpo de la invención. Por "anticuerpo" en el contexto de este aspecto inventivo se entiende un anticuerpo aislado o purificado y también se incluyen antisueros que contienen anticuerpos policlonales sin purificar que se han generado frente a un conjugado de un hapteno de fórmula (I) y una molécula transportadora que confiere antigenicidad.

20 Adicionalmente, dicho método puede requerir también un conjugado según la invención. En una realización particular, además del anticuerpo de la invención se utiliza un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un segundo componente que puede ser una molécula transportadora que confiere antigenicidad o un agente de marcaje detectable.

25 En una realización particular, la detección y/o cuantificación se lleva a cabo mediante un sistema seleccionado de biosensores e inmunoensayos.

30 El término "biosensores", en el contexto de la presente invención, se refiere a instrumentos que permiten detectar y/o cuantificar la presencia de doxiciclina y que están compuestos por tres componentes: un sensor biológico, que es un anticuerpo según la invención; un detector, que puede ser óptico, piezoeléctrico, térmico, magnético, etc; y un transductor, que acopla los otros dos elementos y traduce la señal emitida por el sensor.

35 Por "inmunoensayos", en el contexto de la presente invención, se entiende cualquier método inmunoquímico basado en el uso de anticuerpos. Las principales ventajas

analíticas de los inmunoensayos son la simplicidad y rapidez de las determinaciones, su alta sensibilidad y selectividad y el bajo coste del análisis en relación con otros métodos de referencia para la detección de doxiciclina, como los cromatográficos. Además, la preparación de las muestras es simple y presentan posibilidades de automatización y aplicación para análisis de rutina en condiciones de campo. Los inmunoensayos pueden clasificarse en inmunoensayos que utilizan reactivos (antígenos o anticuerpos) no marcados y los inmunoensayos que utilizan reactivos marcados en los cuales el reactivo (antígeno o anticuerpo) está marcado con un agente de marcaje detectable, tal como un isótopo radiactivo, una enzima, un fluoróforo o una sustancia implicada en una reacción quimioluminiscente, dando lugar a los denominados radioinmunoensayos (por ejemplo, RIA, IRMA), inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, EMIT, CEDIA, ELISA), fluoroinmunoensayos (por ejemplo, FPIA, SLFIA, FETI, DELFIA) o luminoinmunoensayos, respectivamente.

Entre los inmunoensayos que utilizan reactivos marcados se encuentran los inmunoensayos homogéneos y los inmunoensayos heterogéneos; estos últimos comprenden la realización de una o más etapas de separación del antígeno o anticuerpo no unido al otro miembro del par de unión (antígeno o anticuerpo) el cual, en general, estará unido a una fase sólida o soporte, por ejemplo, microplacas, partículas magnéticas, membranas de nitrocelulosa, etc. Asimismo, dependiendo del diseño del ensayo, los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos, dependiendo de si el reactivo (antígeno o anticuerpo) marcado se añade en cantidad limitada o en exceso, respectivamente.

Los inmunoensayos permiten identificar antígenos (técnicas directas) o bien anticuerpos frente a un antígeno (técnicas indirectas). Entre estas técnicas indirectas se encuentran los inmunoensayos indirectos y los inmunoensayos de bloqueo o competición.

La presente invención abarca cualquier tipo de inmunoensayo en el que puedan utilizarse los anticuerpos de la invención para la detección y/o cuantificación de doxiciclina.

En una realización particular, el inmunoensayo es ELISA (del inglés, "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*"). Hay muchos tipos de ELISA, pero en una realización aún más particular el inmunoensayo se selecciona de ELISA competitivo indirecto, ELISA no

competitivo indirecto y ELISA competitivo directo, preferiblemente es ELISA competitivo indirecto.

El término "ELISA no competitivo indirecto", tal como aquí se utiliza, se refiere a un ensayo
5 en el que un conjugado de la invención que actúa como antígeno se inmoviliza sobre una fase sólida, y el anticuerpo de la invención se añade a continuación, uniéndose al conjugado inmovilizado. En anticuerpo puede estar directamente conjugado a un agente de marcaje detectable o bien se añade un segundo anticuerpo marcado que reconoce al anterior. Dicho ensayo se ha utilizado en la presente invención para evaluar el título de
10 anticuerpos generado en el animal no humano inmunizado midiendo la unión de diluciones seriadas de cada antisuero a placas de microtitulación tapizadas previamente con un conjugado de la invención, según se describe en los ejemplos de la presente memoria descriptiva. En una realización preferida el conjugado utilizado es el que comprende un hapteno de fórmula (I) y BSA, preferiblemente un hapteno de fórmula (II) y BSA.

15

El término "ELISA competitivo indirecto", se refiere a un ensayo en el que se añaden conjuntamente una muestra que contiene una concentración desconocida de doxiciclina y un anticuerpo específico según la invención que reconoce doxiciclina. La doxiciclina presente en la muestra competirá con el conjugado inmovilizado por su unión al anticuerpo.
20 Cuando la muestra contiene una gran concentración de doxiciclina no quedan anticuerpos disponibles para reaccionar con los conjugados inmovilizados y por tanto la reacción producida por el agente de marcaje es poco intensa. Mientras que cuando la doxiciclina no está presente en la muestra se unen una gran cantidad de anticuerpos al conjugado inmovilizado en la fase sólida. El término "ELISA competitivo directo" es similar y
25 caracteriza el ensayo en el que se inmoviliza a la placa de ELISA el anticuerpo o antisuero específico y la muestra a analizar se mezcla con un conjugado del hapteno con un agente de marcaje detectable. Como en el caso del ensayo indirecto ambos compuestos compiten por los anticuerpos y la señal resultante del ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de doxiciclina presente en la muestra.

30

Son métodos incluidos en la presente invención, aquellos ensayos ELISA en los que el conjugado de la invención está anclado al soporte, así como aquellos ensayos ELISA en los que lo anclado al soporte es el anticuerpo de la invención.

En una realización de la invención, el inmunoensayo es un ELISA competitivo indirecto que comprende:

- (a) inmovilizar en un soporte sólido un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y una proteína o bien un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un polímero,
- (b) eliminar el conjugado no inmovilizado,
- (c) añadir la muestra a analizar y un primer anticuerpo anti-doxiciclina obtenido al inmunizar un animal con un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y una proteína transportadora que confiere antigenicidad en el soporte sólido del apartado (a) e incubar,
- (d) eliminar el primer anticuerpo no unido al conjugado,
- (e) añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo e incubar,
- (f) eliminar el segundo anticuerpo no unido al primer anticuerpo, y
- (g) detectar y/o cuantificar el complejo obtenido según el apartado (e) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

En la primera etapa del método de la invención (etapa (a)) se inmoviliza sobre un soporte sólido un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y una proteína o bien un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un polímero. En el contexto de la presente realización el soporte sólido son placas para el análisis ELISA. La inmovilización del conjugado en la superficie de un soporte como el plástico de poliestireno está dirigida por la química de la superficie. La capacidad de inmovilización de los conjugados, que en este caso actúan como antígenos competidores, depende de muchos factores, tales como el tiempo y la temperatura. La etapa de inmovilización del conjugado puede incluir el bloqueo de los espacios del soporte que no hayan sido ocupados por dichos conjugados, ya que la unión al mismo no es selectiva y de no llevarse a cabo el bloqueo se podrían unir otras moléculas no específicas. El bloqueo se lleva a cabo mediante proteínas o detergentes, preferiblemente detergentes no iónicos. Con el fin de disminuir las interacciones inespecíficas, el conjugado que se inmoviliza debe comprender una proteína diferente a la empleada en el conjugado utilizado como inmunógeno. En una realización preferida el conjugado inmovilizado en esta etapa comprende un hapteno de fórmula (II) y una proteína transportadora seleccionada de BSA, OVA y CONA, preferiblemente OVA.

La etapa (b) del método consiste en eliminar el conjugado no inmovilizado. Típicamente, esto se lleva a cabo mediante lavados, habitualmente entre 1 y 10 lavados, preferiblemente de 2 a 5 lavados. Los lavados tienen la finalidad de eliminar los conjugados que no se hayan inmovilizado, de forma que todo aquello que sea detectado sea específico y deseado. Los lavados se hacen preferiblemente con una solución de tampón fosfato PBS 25 mM, con una solución salina con una concentración del 2% que contiene iones Ca^{2+} y un pH de 5,5. Más preferiblemente, los lavados se realizan con tampón PBST, es decir, tampón PBS con Tween® 20 al 0,001%. Tween® 20 es un detergente no iónico, por lo que en caso de usar PBST como tampón de lavado se bloquean de forma continua los posibles espacios libres en el soporte sólido.

La tercera etapa del método de la invención (etapa (c)) consiste en añadir la muestra a analizar y un primer anticuerpo anti-doxiciclina según la invención en el soporte sólido del apartado (a) e incubar. Esta etapa es la etapa competitiva del ensayo. La muestra a analizar contiene la doxiciclina o el analito derivado de doxiciclina que se desea detectar y/o cuantificar. Por "primer anticuerpo anti-doxiciclina" se entiende un anticuerpo según la invención, generado contra un conjugado que comprende un hapteno de fórmula general (I) y una molécula transportadora que confiere antigenicidad, preferiblemente frente a un conjugado que comprende un hapteno de fórmula general (II) y la molécula transportadora HCH. La doxiciclina o el analito derivado de doxiciclina de la muestra a analizar y el conjugado inmovilizado en el soporte sólido de la etapa (a) competirán por la unión del primer anticuerpo anti-conjugado. Como el experto en la técnica entenderá, el hapteno del conjugado inmovilizado de la etapa (a) y el hapteno del conjugado utilizado para la obtención de los anticuerpos de la etapa (c) debe ser el mismo. Sin embargo, el segundo componente de ambos conjugados puede variar.

La etapa (c) es la etapa crucial del ensayo. En una realización preferida la etapa (c) tiene una duración comprendida entre 10 minutos y 1 hora, preferiblemente 30 minutos. La agitación durante esta etapa favorece la unión de los anticuerpos. Por eso en una realización preferida la etapa (c) se realiza en agitación.

Este ensayo ha demostrado tolerar un amplio rango de fuerzas iónicas y valores de pH. Los inventores han optimizado el tampón utilizado en la etapa competitiva del ensayo (etapa (c)). En una realización de la invención la etapa (c) se realiza en presencia de un tampón que tiene las siguientes características:

- i. una concentración de detergente no iónico inferior a 0,01%, preferiblemente de 0,001%
- ii. un pH comprendido entre 4 y 9, preferiblemente de 5,5
- 5 iii. una conductividad comprendida entre 10 y 70 mS/cm, preferiblemente de 32 mS/cm; y
- iv. una concentración de iones Ca^{2+} comprendida entre 0,1 y 2,0 mM, preferiblemente de 1 mM.

10 Por “tampón” se entiende, en el contexto de la presente invención, cualquier agente capaz de controlar el pH de la solución que cumpla las características mencionadas anteriormente. En una realización preferida el tampón es de tipo fosfato.

15 El término “detergente no iónico”, según se usa en la presente invención, se refiere a tensioactivos que no se disocian en agua, por lo que carecen de carga y esto hace que sean activos en rangos de pH muy variable. Ejemplos de detergentes no iónicos para su uso en la presente invención son, sin limitación, la serie Tween®, Triton o Brij. En una realización preferida el detergente es Tween® 20.

20 El término “pH” se refiere a la medida de la acidez o la alcalinidad de una solución. El pH típicamente va de 0 a 14 en disolución acuosa, siendo ácidas las disoluciones con pH inferiores a 7 y alcalinas las que tienen pH superiores a 7. El pH=7 indica la neutralidad de la disolución, donde el disolvente es agua. La determinación del pH de una solución puede hacerse de forma precisa mediante un potenciómetro (o pH-metro) y también de forma
25 aproximada mediante indicadores, por métodos ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Puesto que el valor del pH puede variar con la temperatura, en el contexto de esta invención la medición del pH se realiza a 20°C.

30 El término “conductividad”, según se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un medio líquido para conducir la corriente eléctrica. Las unidades de la conductividad son Siemens por metro (S/m). La conductividad en medios líquidos está relacionada con la presencia de sales en solución, cuya disociación genera iones positivos y negativos capaces de transportar la energía eléctrica si se somete el líquido a un campo eléctrico. Estos conductores iónicos se denominan electrolitos o conductores electrolíticos.
35 La conductividad se determina mediante un conductímetro electrónico por métodos

conocidos en el estado de la técnica. En una realización preferida la conductividad se consigue mediante la adición de una o más sales al tampón, preferiblemente NaCl. Sales que pueden utilizarse para mejorar la conductividad son típicamente haluros de metales alcalinos o alcalino-térreos y en algunos casos también los correspondientes nitratos o percloratos. En una realización preferida el tampón es una solución salina al 2%.

La concentración de iones Ca^{2+} ha demostrado ser útil para estabilizar la estructura de la doxiciclina. Por tanto, en una realización preferida el tampón comprende iones calcio, concretamente una sal de Ca^{2+} .

10

La muestra a analizar y el primer anticuerpo anti-conjugado que se añaden al soporte sólido durante la etapa (c) pueden, aunque no necesariamente, haber sido pre-incubados con anterioridad. Por tanto, en una realización de la invención la muestra a analizar y el primer anticuerpo de la etapa (c) han sido pre-incubados antes de añadirlos al soporte sólido. La pre-incubación consiste en mezclar la muestra y anticuerpos anti-doxiciclina según la invención durante un tiempo determinado, preferiblemente durante toda la noche, antes de añadirlos al soporte sólido. Sin embargo los resultados obtenidos no se alteran en ausencia de esta pre-incubación por lo que en otra realización la muestra a analizar y el primer anticuerpo de la etapa (c) se han añadido al soporte sólido sin pre-incubación.

20

La cuarta etapa del método de la invención (etapa (d)) consiste en eliminar el primer anticuerpo no unido al conjugado inmovilizado. Típicamente, esto se realiza mediante lavados en las mismas condiciones que la etapa (b).

25

La siguiente etapa del método de la invención (etapa (e)) consiste en añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo e incubar. El término "segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable" se refiere a un anticuerpo capaz de reconocer al primer anticuerpo anti-doxiciclina de la invención utilizado en la etapa (c). Dicho segundo anticuerpo está conjugado con un compuesto capaz de reaccionar con algún sustrato, de forma que se derive de ello una detección cromogénica, fluorogénica y/o quimioluminiscente. Este compuesto puede unirse al anticuerpo directamente o a través de otro componente. El segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable debe obtenerse en un animal diferente del que se ha empleado para producir el primer anticuerpo anti-doxiciclina de la invención. Preferiblemente, el animal utilizado para la

35

obtención del segundo anticuerpo es una cabra. En una realización preferida, el segundo anticuerpo está conjugado con un enzima, preferiblemente peroxidasa. Las condiciones adecuadas para que tenga lugar la unión del segundo anticuerpo al primer anticuerpo son conocidas por los expertos en la materia.

5

A continuación tiene lugar la etapa (f) que consiste en eliminar el segundo anticuerpo no unido al primer anticuerpo. Típicamente, esto se efectúa mediante un lavado en las mismas condiciones que en las etapas (b) y (d).

10 Finalmente, la última etapa (g) consiste en la detección y/o cuantificación del complejo obtenido según el apartado (e) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente. Un "sustrato indicador" es una sustancia capaz de reaccionar con el agente de marcaje del segundo anticuerpo dando como resultado un compuesto cromóforo, fluorescente o quimioluminiscente que puede
15 detectarse por métodos conocidos en el estado de la técnica. Sustratos indicadores adecuados para llevar a cabo la presente invención son conocidos por el experto en la materia y accesibles a partir de diversas fuentes comerciales. Preferiblemente, el sustrato indicador es cromogénico, como por ejemplo la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) o la fenilendiamina, sin limitación de utilizar otros
20 sustratos. Cuando se emplean sustratos cromogénicos, la presencia de doxiciclina o de haptenos de fórmula general (I) en la muestra se evidencia por la aparición de un color cuya intensidad varía directamente con el número de moléculas unidas al primer anticuerpo anti-conjugado añadido en la etapa (c) y su cuantificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de espectrofotometría. Si se emplea un sustrato fluorogénico
25 la detección y cuantificación se realiza por medio de fluorimetría, y si el sustrato es quimioluminiscente, la señal se puede cuantificar por medio de un luminómetro.

En una realización preferida la enzima se selecciona de fosfatasa alcalina, peroxidasa y glicosidasa, preferiblemente peroxidasa.

30

En una realización preferida el sustrato es cromogénico y la reacción es enzimática. En este caso, la reacción es inhibida pasado un tiempo desde que se añadió el sustrato y para ello se cambian las condiciones óptimas de funcionamiento de la enzima que se esté utilizando.

35

Cuando la reacción enzimática ya ha tenido lugar, se mide la absorbancia del producto obtenido en la etapa (e). El término “absorbancia” hace referencia tanto a la absorción de luz por parte del producto como a su cálculo indirecto mediante la medida de la transmitancia o cualquier otro parámetro que permita determinar la concentración mediante
5 la comparación con curvas de referencia de medidas tomadas con patrones a diferentes concentraciones conocidas de doxiciclina. Se debe comparar la absorbancia medida en la etapa (g) con la absorbancia del control y determinar la concentración de doxiciclina en la muestra. El control es un conjunto de soluciones que contienen doxiciclina a concentraciones conocidas, de modo que los valores de absorbancia y los valores de
10 concentración mantienen una relación lineal (Ley de Lambert-Beer) en un rango de absorbancia permitiendo crear una recta de calibrado o de regresión lineal. Las concentraciones de doxiciclina presente en la muestra son cuantificadas interpolando los valores de absorbancia en la recta de calibrado o recta de regresión lineal.

15 El ensayo de la presente invención ha demostrado tener una sensibilidad (IC_{50}) de 1,26 y un límite de detección de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para doxiciclina (Tabla 3). La IC_{50} se define como la concentración de doxiciclina que inhibe la señal máxima (ausencia de doxiciclina y compuestos relacionados en la muestra) un 50%. Mientras que el límite de detección se define como la concentración de doxiciclina que origina una disminución de la señal
20 respecto al blanco del 10%. Además, los anticuerpos de la presente invención han demostrado ser muy específicos para doxiciclina, como lo demuestra la ausencia de reactividad cruzada (<1%) con otros antibióticos de la familia de las tetraciclinas. Dicha reactividad cruzada se calcula aplicando la siguiente ecuación: $RC (\%) = [IC_{50} (\text{doxiciclina}) / IC_{50} (\text{tetraciclina interferente})] \times 100$. Métodos adecuados para determinar estos
25 parámetros se detallan en el apartado de Materiales y Métodos de la presente invención.

Los autores de la presente invención han realizado experimentos de determinación de doxiciclina en muestras de leche, demostrando que el ensayo puede aplicarse al análisis de estas muestras tras un método de tratamiento sencillo alcanzando buenos valores de
30 detectabilidad. Por lo tanto, en una realización de la invención la muestra alimentaria es leche. Por “leche” en el contexto de la presente invención se entiende cualquier tipo de leche de cualquier origen animal (oveja, cabra, yegua, burra, vaca, búfala, yaka, camella, llama, alpaca, hembra del reno, alcesa) y sometida a cualquier tipo de tratamiento. Así, puede tratarse de leche entera, desnatada, semidesnatada, etc. También incluye

fracciones de leche, tales como el llamado suero de leche. El suero de leche es el componente líquido obtenido tras la coagulación de la leche.

Un ensayo inmunoquímico puede estar afectado por la matriz de la muestra (materia orgánica, pH, sales, etc.). Cuando la muestra a analizar es leche, el efecto matriz puede evitarse diluyendo dicha muestra o bien utilizando el suero de leche obtenido tras precipitación de la leche entera en una masa semisólida compuesta de caseína.

En una realización de la invención la muestra de leche está diluida a una dilución al menos de 1/5 para evitar interferencias en el ensayo y hasta la dilución necesaria para llevar la concentración que se quiere determinar al margen de trabajo del ensayo y preferiblemente a una dilución 1/500, por ejemplo si se quiere controlar el producto según la regulación europea de seguridad alimentaria (en vigor en el año 2010).

En otra realización de la invención la muestra de leche es suero de leche obtenido mediante un pre-tratamiento de la leche que comprende:

- (i) precipitación con un agente seleccionado de sulfato de amonio saturado y tampón Mc Ilvaine,
- (ii) centrifugación del precipitado obtenido; y
- (iii) separación del suero de leche del precipitado.

El pre-tratamiento de la muestra de leche tiene una primera etapa (etapa (i)) en la que precipitan la caseína y la grasa. Dicha precipitación puede llevarse a cabo con sulfato de amonio saturado o con tampón Mc Ilvaine (McIlvaine, T.C. (1921). "A buffer solution for colorimetric comparison". J. Biol. Chem. 49 (1): 183–186).

En la etapa (ii) se produce la centrifugación del precipitado obtenido para separar dicho precipitado de la fase líquida que constituye el suero de leche.

En la etapa (iii) el suero de leche se separa del precipitado obtenido tras la centrifugación mediante una etapa de filtrado, preferiblemente a través de un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro.

La muestra de suero de leche así obtenida puede utilizarse directamente en el método de la presente invención o bien puede diluirse previamente. En una realización, la muestra de suero de leche está diluida entre 1/12,5 y 1/100, preferiblemente 1/25.

- 5 El método de la presente invención permite analizar un elevado número de muestras de leche para descartar aquellas que contienen doxiciclina o que presentan niveles de doxiciclina superiores a un determinado límite. Por tanto, en una realización los métodos de la presente invención se utilizan en cribaje de alto rendimiento de muestras de leche.
- 10 Todas las realizaciones particulares de los conjugados y anticuerpos de la presente invención son aplicables también a los métodos de la invención.

KITS DE LA INVENCION

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para la detección y/o cuantificación de doxiciclina o de un analito derivado de doxiciclina en una muestra que comprende al menos un conjugado seleccionado de:

- 15 a) un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y una proteína transportadora,
- b) un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un agente de marcaje detectable, y
- 20 c) un conjugado que comprende un hapteno de fórmula (I) y un polímero;
- , y al menos un anticuerpo según la invención.

En una realización aún más preferida el kit comprende además un anticuerpo contra los anticuerpos anti-doxiciclina según la invención.

25 Todas las realizaciones particulares de los conjugados y anticuerpos de la presente invención son aplicables también a los kits de la invención.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos, que deben ser considerados como meramente ilustrativos y en ningún caso limitativos del ámbito de la presente invención.

30

EJEMPLOS

1. Material y métodos

35

A. Química

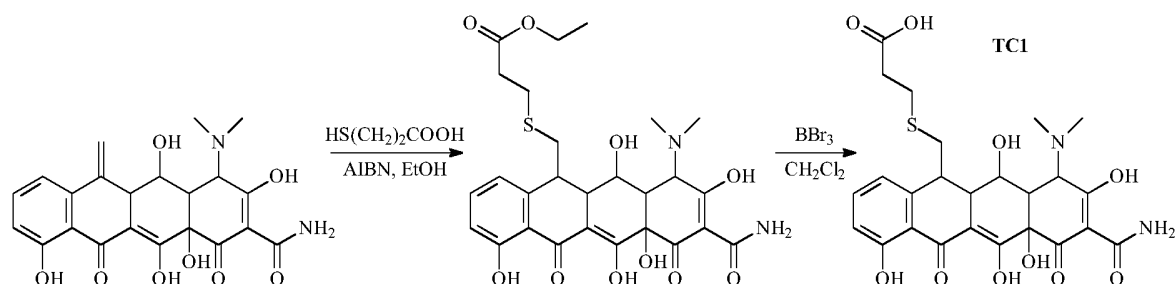
Métodos Generales e Instrumentación.

La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en hojas de aluminio cubiertas por gel de sílice 60 F2540 de 25 mm (Merck, Darmstadt, Alemania) tratadas previamente con solución acuosa saturada de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (Na_2EDTA), seguido por su posterior activación a 130 °C durante 2 horas. A menos que se indique lo contrario, la purificación de las mezclas de reacción se llevó a cabo por cromatografía de "flash" con gel de sílice como fase estacionaria siendo previamente impregnada con una solución saturada acuosa de Na_2EDTA por inmersión y una posterior activación a 130 °C durante 2 horas. Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN se obtuvieron con un espectrómetro (500 MHz ^1H y ^{13}C RMN de 125) Varian Inova-500 (Varian Inc., Palo Alto, CA). Los análisis por HPLC se realizaron con una bomba de Merck Hitachi L-7100, un detector de diodo array L-7455, un muestreador automático L-7200, y una interfaz D7000 (Merck, Darmstadt, Alemania). Los cromatogramas fueron procesados con el software HSM (Merck, Darmstadt, Alemania). Se utilizó una columna Purosphere C18 de 15 cm x 4.6 mm, de 5 micras de tamaño de partícula (Merck, Darmstadt, Alemania), y los análisis se realizaron en modo isocrático usando 0,01 M de ácido oxálico:acetonitrilo (ACN):MeOH 70:20:10 como fase móvil a un flujo de 1,0 mL min^{-1} . Las longitudes de onda de detección para controlar las reacciones se fijaron en 250 y 365 nm. Los análisis por LC/ESI/MS (cromatografía líquida/electrospray de ionización/espectrometría de masas) se realizaron en un modelo de Waters (Mildford, MA, EE.UU.) compuesto por un sistema de UPLC™ Acquity directamente interconectado a un sistema de Micromass LCT Premier XE MS equipado con una fuente ESI LockSpray™ para el monitoreo de iones positivos. Los datos fueron procesados con el software (Mildford, MA, EE.UU.) MassLynx (V 4.1).

Síntesis del hapteno TC1.

Los haptenos de inmunización y competidores TC1 fueron sintetizados siguiendo el esquema mostrado a continuación. Los detalles experimentales sobre los procedimientos de síntesis y purificación se pueden encontrar a continuación. La caracterización espectroscópica y espectrométrica del hapteno también se proporciona.

39



3-(((4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*R*,12*aS*)-2-carbamoil-4-(dimetilamino)- 3,5,10,12,12*a* -pentahidroxi-

5 1,11-dioxo-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a* -octahidrotetracén-6-il)metiltio)propanoato de etilo (**1**).

Se añadió el clorhidrato de metaciclina (MC) (0,5 g, 1,04 mmol) a un matraz de fondo redondo para suspenderlo en EtOH (10 ml) siendo añadidos posteriormente ácido 3-mercaptopropiónico (2,4 ml, 27,59 mmol) y azobisisobutironitrilo (AIBN, 25 mg). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo y con agitación durante 12 horas bajo atmósfera de N₂, hasta la completa desaparición del material de partida por análisis de TLC (9:1 CH₂Cl₂:MeOH como fase móvil) y HPLC-UV, y siendo posteriormente suspendido en Et₂O frío (100 ml). El precipitado obtenido fue centrifugado para facilitar la eliminación del ácido 3-mercaptopropiónico y el sólido se recogió para ser disuelto en agua (3 mL) con el pH ajustado a 4,5. La solución acuosa se lavó con CHCl₃ (5 ml) para eliminar el resto de mercaptano, y finalmente se realizó una extracción con CH₂Cl₂ (50 ml x 3). La fase orgánica se evaporó a sequedad al vacío para obtener un sólido marrón-verdoso **1** (184,4 mg, 30,5%).

¹H NMR (500MHz, DMSO-D₆) □: 1.17 (3H, t), 2.31 (2H, d), 2.43 (6H, s), 2.55 (2H, m), 2.69 (2H, m), 3.04 (1H, m), 3.08-3.51 (3H, m), 3.75 (1H, m), 4.05 (2H, q), 6.80 (1H, d), 6.97 (1H, d), 7.48 (1H, t).

Ácido 3-(((4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*R*,12*aS*)-2-carbamoil-4-(dimetilamino)- 3,5,10,12,12*a* -pentahidroxi-1,11-dioxo-1,4,4*a*,5,5*a*,6,11,12*a* -octahidrotetracén-6-il)metiltio)propanoico (**TC1**).

25 Una solución del sustrato anterior **1** (308 mg, 0,54 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml) se enfrió a -10 °C para después ser añadida gota a gota a una solución de BBr₃ (1 M en hexano, 3 ml, 3 mmol) bajo agitación, seguido de una nueva adición de CH₂Cl₂ (15 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a -10 °C durante 1 hora bajo atmósfera de N₂ y luego a 25 °C hasta la completa desaparición del material de partida por análisis de TLC (9:1 CH₂Cl₂:MeOH como fase móvil). La reacción se terminó por la cuidadosa adición gota a gota del crudo a agua

30

(30 ml). Las fases se separaron, la fase orgánica se lavó con H₂O (3 x 20 ml) y las fases acuosas combinadas se evaporaron a sequedad. El residuo se recogió en H₂O y se cromatografió en una resina de intercambio iónico "Macro Prep High Q Supgrat", utilizando una solución de ácido acético al 5% como fase móvil. La concentración al vacío de las fracciones positivas llevó al producto como un sólido marrón-amarillo (214,1 mg, 73,0%).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 2.20 (2H, d), 2.51 (6H, s), 2.63 (2H, m), 2.69 (2H, m), 3.13 (1H, m), 3.20-3.48 (3H, m), 3.99 (1H, m), 6.66 (1H, d), 6.84 (1H, d), 7.47 (1H, t). HRMS (+EI) calculado para C₂₅H₂₉N₂O₁₀S (M+) 549.1543. Encontrado: 549.1523.

10 B. Inmunoquímica

Métodos Generales e Instrumentación.

El MALDI-TOF-MS (espectrómetro de masas con láser asistido por matriz de ionización de desorción con tiempo de vuelo) utilizado para el análisis de los conjugados de proteínas fue una estación de trabajo Perspective BioSpectrometry suministrada con el 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). El pH y la conductividad de todos los tampones y soluciones se midieron con un medidor de pH 540 GLP y un conductímetro LF 340, respectivamente (WTW, Weilheim, Alemania). Las micro placas de poliestireno fueron adquiridas a Nunc (Maxisorp, Roskilde, Dinamarca). Las etapas de lavado se realizaron en un lavador de microplacas SLY96 PW (SLT Labinstruments GmbH, Salzburgo, Austria). Una plataforma vibratoria Heidolph Titramax 1000 (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EE.UU.) se utilizó para agitar las microplacas a 900 rpm. Las correspondientes absorbancias se leyeron con el equipo SpectramaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las curvas de la competencia fueron analizadas con una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando el software SoftmaxPro v4.7 (Molecular Devices) y GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Los reactivos químicos utilizados en la síntesis se obtuvieron de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI).

Otros productos químicos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La preparación de los inmunoreactivos utilizados se describe a continuación. Las tetraciclinas utilizadas para los estudios de reactividad cruzada fueron suministradas gentilmente por UNISENSOR SA (Lieja, Bélgica).

35 Tampones

A menos que se indique lo contrario, el tampón fosfato salino (PBS) es un tampón fosfato 0,025 M en una solución salina al 2% (343 mmol L⁻¹ de NaCl, 6,8 mmol L⁻¹ KCl) que contiene cationes divalentes de calcio (1 L⁻¹ mmol CaCl₂), siendo el pH de 5,5. PBST es PBS con Tween 20 al 0,001%. El tampón borato es ácido bórico-borato de sodio 0,25 M, pH 8,7. El tampón de recubrimiento es carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. El tampón de citrato es una solución de citrato de sodio 0,04 M, pH 5,5. La solución de sustrato contiene un 0,01% de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) y 0,004% de H₂O₂ en tampón de citrato.

10 Inmunoreactivos

Inmunógenos: TC1-HCH: El hapteno TC1 se acopló a hemocianina de molusco (HCH) siguiendo el método del anhídrido mixto (AM) tal como se ha descrito anteriormente [14]. Posteriormente, el ácido carboxílico del TC1 (10 mmol) se activó con cloroformiato de isobutilo (14 mmol) en presencia de tributilamina (12 mmol) en DMF anhidra (dimetilformamida, 200 µL) para añadirse a una solución de la proteína (10 mg) en tampón de borato (1,8 mL). La mezcla se agitó 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente durante la noche a 4 ° C.

Bioconjugados: TC1-BSA, TC1-CONA, TC1-OVA y TC1-HRP, fueron preparados usando el método del éster activo (EA) [15] mediante la activación del hapteno (10 mmol) con N-hidroxisuccinimida (NHS, 12,5 mmol) y dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 25 mmol) en DMF anhidra (200 µL) y posteriormente añadiendo dicha solución a la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante, 2 mg) y a las proteínas BSA (albúmina de suero bovino, 10 mg), CONA (conalbúmina, 10 mg) o OVA (ovoalbúmina, 10 mg) en solución de tampón borato (1,8 mL). Alternativamente, también se prepararon bioconjugados de TC1-BSA por el método del anhídrido mixto según se muestra en la Tabla 1.

Análisis de la densidad de hapteno.

Las densidades de hapteno de los bioconjugados se calcularon midiendo el peso molecular (PM) de las proteínas nativas en comparación con el de los conjugados mediante análisis por MALDI-TOF-MS. En este sentido, los espectros de MALDI fueron obtenidos mediante la mezcla de 2 µL de la matriz recién preparada (ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico, 10 mg mL⁻¹ en CH₃CN/H₂O 70:30, 0,1% ácido trifluoroacético) con 2 µL de una solución de los conjugados o de las proteínas en CH₃CN/H₂O 70:30, 0,1% TFA (10 mg

mL⁻¹). La densidad de hapteno (δ hapteno) se calculó según la siguiente ecuación: $\{PM(\text{conjugado}) - PM(\text{proteína})\} / PM(\text{hapteno})$. La eficacia de acoplamiento evaluada por MALDI-TOF-MS de los inmunoreactivos correspondientes a BSA haptenizada se muestra en la tabla 1.

5

Tabla 1: Densidades de hapteno de los conjugados de BSA^a

Immunoreactivo	δ-Hapteno^b	% Conjugación^c
TC1-BSA (AM)	3.3	9-11
TC1-BSA (EA)	10.8	31-36

^a Análisis por MALDI-TOF-MS

^b Moles de hapteno por mol de proteína.

10 ^c Conjugación calculada basada en que la BSA tiene 30-35 grupos lisina libres.

Antisueros policlonales.

Los antisueros policlonales As180, As181 y As182 fueron obtenidos mediante la inmunización de conejos (hembras) blancos New Zealand con pesos alrededor de 1-2 Kg con TC1-HCH siguiendo un protocolo ya descrito [15]. La evolución de los títulos de anticuerpos se evaluó con el formato ELISA indirecto no competitivo, mediante la medición de la unión de diluciones seriadas de cada antisuero en placas de microtitulación tapizadas previamente con TC1-BSA. Una vez obtenidos títulos de anticuerpos aceptables, los animales fueron desangrados y la sangre fue recolectada en tubos vacutainer provistos con un gel de separación del suero. Los antisueros se obtuvieron por centrifugación y se almacenaron a -80 °C en presencia de 0,02% NaN₃.

ELISA Indirecto competitivo TC1-OVA/As181.

Las placas de microtitulación se tapizaron con TC1-OVA (0,625 mg mL⁻¹ en tampón citrato, 100 µL/pocillo) durante la noche a 4 °C cubiertas con selladores adhesivos. Al día siguiente, las placas fueron lavadas cuatro veces con PBST (300 µL/pocillo), antes de añadir las muestras de leche o los estándares (DC u otro tipo de analitos relacionados, a diferentes concentraciones desde 50000 nM a 0,005 nM en PBST) a los pocillos (50 µL), seguido por el antisuero As181 (diluido 1/500 en PBST, 50 µL/pocillo) incubándose durante 30 min a temperatura ambiente y con agitación. Las placas fueron lavadas como se ha descrito anteriormente, para añadir después una solución de anti IgG-HRP (1/6000 en PBST 10 mM) a los pocillos (100 µL/pocillo) y ser incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavaron de nuevo para añadir la

solución de sustrato (100 µL/pocillo). El desarrollo del color se detuvo después de 30 min a temperatura ambiente con H₂SO₄ 4N (50 µL/pocillo), para leer las absorbancias a 450 nm. Las curvas estándar de calibrado se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros de acuerdo con la siguiente fórmula: $y = (A - B/[1 - (x/C)^D]) + B$, donde 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 pendiente en el punto de inflexión de la curva sigmoidea. A menos que se indique lo contrario, los datos presentados corresponden al promedio de al menos dos repeticiones. **Estudios de especificidad.** DC, TC, y OTC fueron utilizados como patrones, preparados a partir de stocks 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), y CTC en 50 HCl mM siendo todos ellos guardados a 4 °C. Las curvas de calibrado se prepararon en PBST para realizar el ELISA, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Los valores de reactividad cruzada (RC) se calcularon de acuerdo a la ecuación $\{IC_{50} [nM] (DC)/IC_{50} [nM] (\text{compuesto que produce reacción cruzada})\} \times 100$. **Estudios de precisión.** Este parámetro se evaluó mediante la preparación de ocho muestras diferentes adicionadas a ciegas en tampón PBST y su medición por duplicado en el ELISA.

Experimentos en leche.

Muestras. La Agencia Española para la Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) nos suministró leche entera, desnatada y semi desnatada libre de antibióticos. **Tratamientos de muestras.** (i) Sulfato de amonio saturado (0,45 mL) fue añadido a muestras de leche entera (1 mL). (ii) Tampón Mc Ilvaine (0,30 mL) a pH 3 se añadió a muestras de leche entera (1 mL). Las mezclas provenientes de los dos métodos fueron respectivamente agitadas, centrifugadas y filtradas (tamaño de poro de 0,45 µm) para separar el suero de leche del precipitado. **Estudios de efecto matriz.** Las interferencias no específicas producidas por la leche han sido evaluadas por la preparación de curvas de calibrado estándar en suero de leche a varios factores de dilución (1/12,5, 1/25, 1/50, 1/100) y siendo analizadas posteriormente por el ELISA para comparar el paralelismo con la curva estándar preparada en tampón. **Estudios de recuperación.** La media de recuperación del analito después del tratamiento de la matriz se evaluó dopando muestras de leche por triplicado a cuatro niveles de concentración (25, 50, 100 y 200 mg kg⁻¹) y, después de la precipitación de la leche, siendo analizada en curvas de calibrado estándar preparadas en suero de leche. **Estudios de precisión.** Este parámetro se evaluó mediante la preparación de diversas muestras ciegas en tampón y leche dopándolas a diferentes niveles de concentración para su posterior medición en el ELISA. En todos los casos los datos se corrigieron con el correspondiente factor de recuperación.

2. Resultados

El hapteno TC1 se sintetizó siguiendo los procedimientos previamente descritos por Blackwood *et al.* para modificar 6-metilentetraciclinas [16-18] con ligeras modificaciones.

5 La reacción consistió en una adición radicalaria anti-Markovnikov del ácido 3-mercaptopropiónico al doble enlace del carbono 6 exocíclico de la metaciclina (MC), usando una cantidad catalítica de AIBN como iniciador radicalario en etanol. A diferencia de los resultados obtenidos por Nelson y sus colaboradores [13] la mezcla obtenida no contenía el ácido carboxílico, sino su correspondiente éster etílico (MC-CH₂-S-(CH₂)₂-

10 COOEt) formado en el medio de reacción, que utiliza etanol como disolvente, con un rendimiento moderado. El éster se purificó por cromatografía en columna de "flash" pre-tratada con Na₂EDTA para evitar una retención excesiva del producto en la fase sólida debido a la formación de quelatos con cationes divalentes. A continuación, la hidrólisis del éster purificado bajo condiciones básicas fuertes permitió obtener el hapteno TC1 deseado.

15

TC1 se unió covalentemente a través de sus grupos carboxílicos a los residuos de lisina de la proteína HCH usando el método del anhídrido mixto y el bioconjugado TC1-HCH se usó para generar anticuerpos policlonales As180, As181 y As182. TC1 fue conjugado a las proteínas HRP, BSA, CONA y OVA para utilizar dichos conjugados como antígenos de

20 recubrimiento o trazadores enzimáticos en el desarrollo de ELISA competitivos. El cribado de todas las posibles combinaciones de antisuero/enzima trazador (As/ET) y antisuero/antígeno de recubrimiento (As/CA) se realizó usando DC como analito. Previamente, las concentraciones de los inmunoreactivos se seleccionaron mediante experimentos de titulación bidimensional donde se evaluó la avidéz del antisuero por los

25 antígenos de recubrimiento mejor reconocidos (CA). Posteriormente, las diferentes combinaciones antígeno de recubrimiento/anticuerpo se analizaron en un diseño competitivo para evaluar la capacidad de detectar DC y para seleccionar la mejor combinación antígeno de recubrimiento/anticuerpo.

30 La combinación As181/TC1-OVA se seleccionó para posteriores estudios debido a sus excelentes características y a la reproducibilidad observada en experimentos repetitivos. El bioconjugado TC1-OVA tenía una densidad de hapteno de 11 moles por mol de proteína según análisis por MALDI-TOF-MS.

El ELISA As181/TC1-OVA se investigó posteriormente con el objetivo de mejorar su rendimiento y para caracterizar su comportamiento en medios con diferentes parámetros físico-químicos (pH, fuerza iónica, etc.). No se observaron efectos significativos en la capacidad de detección del ensayo tras una preincubación durante toda la noche del
5 antisuero con el analito antes de la etapa competitiva o al variar la duración de la etapa competitiva de 10 minutos a 1 hora. Para evaluar la influencia de los parámetros físico-químicos se realizaron estudios variando la composición del tampón usado en la etapa competitiva. Concretamente, para evaluar el efecto de la fuerza iónica se varió la concentración de NaCl manteniendo constante la concentración de sales fosfato; y para
10 evaluar el efecto de la concentración de cationes divalentes Ca^{2+} se disolvió CaCl_2 en PBS a diferentes concentraciones. Se observó que la concentración de Tween® 20 en el tampón de ensayo influyó la detectabilidad del mismo. Por lo tanto, la mejor capacidad de detección se consiguió al reducir el porcentaje de este detergente (Figura 1A). Por lo que se refiere al pH, el ensayo toleró bastante bien valores de pH entre 4 y 9 dando el mejor
15 rendimiento a valores de pH de 5,5, que corresponden a la máxima concentración de la forma zwitteriónica según los valores de pKa descritos para las TC [1]. A valores de pH superiores a 9 la señal del ensayo está casi inhibida mostrando unos valores de IC_{50} inesperadamente altos (Figura 1B). Por lo que se refiere a la fuerza iónica, en ausencia de sales la señal del ensayo se afectó ligeramente pero disminuyó su capacidad de detección.
20 Por otra parte, cuando la fuerza iónica aumentó, se observó una mejora de la capacidad de detección. Una conductividad alrededor de 32 mS/cm se consideró la más apropiada para llevar a cabo el ensayo (Figura 1C). Finalmente, la adición de Ca^{2+} parece estabilizar la estructura de los analitos de TC, debido a su tendencia a formar quelatos, y, por lo tanto, mejorando la reproducibilidad del ensayo (Figura 1D).

25

La Figura 2 muestra una curva de calibración estándar que corresponde a la media de cuatro ensayos realizados en diferentes días usando replicados de dos pocillos en las condiciones seleccionadas tras los experimentos mencionados anteriormente. Las características del inmunoensayo se muestran en la Tabla 2. Como puede observarse, la
30 detectabilidad conseguida es muy buena. El ensayo muestra una IC_{50} de $1,26 \pm 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y un límite de detección (LOD; 90% de la dosis cero) de $0,10 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. El intervalo de trabajo se situó entre $0,25 \pm 0,06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $6,70 \pm 0,59 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (del 20% al 80% de la respuesta del ensayo a la dosis cero).

Tabla 2. Características del ensayo ELISA de doxiciclina

Condición	Valores	Parámetros del ensayo As181/TC1-OVA	Valor ^a
Tiempo de pre-incubación	0 min	Señal _{min}	0,19 ± 0,01
Tiempo de competición	30 min	Señal _{max}	0,81 ± 0,01
pH	5,5	Pendiente	- 0,90 ± 0,11
Fuerza iónica	35,2 mS/cm (25 mM PBS)	R ²	0,998 ± 0,002
Tween® 20	0,001%	IC ₅₀ , µg L ⁻¹	1,26 ± 0,05
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	1 mM	Intervalo de trabajo, µg L ⁻¹	Desde 0,25 ± 0,06 hasta 6,70 ± 0,59
		LOD, µg L ⁻¹	0,10 ± 0,03

^a Valores obtenidos correspondientes al promedio y desviación estándar de seis curvas de calibración realizadas en cuatro días distintos. Las curvas de calibración se midieron usando replicados de tres pocillos.

Determinaciones de reactividad cruzada.

se realizaron estudios de especificidad preparando curvas de calibración con varios compuestos estructuralmente relacionados, incluyendo DC, TC, OTC, CTC y midiéndolos con el ensayo. De todas las tetraciclinas testadas sólo DC fue significativamente reconocida dentro de las concentraciones evaluadas, demostrando así que el ensayo posee una alta especificidad (Tabla 3).

Tabla 3. Reactividad cruzada de compuestos relacionados en el ensayo ELISA As181/TC1-OVA.

Compuesto	ELISA		
	IC ₅₀ (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	% RC ^a
<i>Doxiciclina</i>	1,26	0,10	100 %
Oxitetraciclina	816,3	31,1	< 1 %
Clortetraciclina	443,7	26,7	< 1 %
Tetraciclina	3605,0	127,8	< 1 %

^a La reactividad cruzada (RC) se expresa como porcentaje del IC₅₀ (nM) de DC dividida por el IC₅₀ (nM) de los otros compuestos testados.

Estudio de precisión

La precisión del ensayo se evaluó midiendo varias muestras ciegas preparadas en tampón. Los resultados se muestran en la Figura 3, que corresponde a la correlación encontrada

entre los valores de concentración medidos y dopados. Como puede observarse, los resultados obtenidos se corresponden muy bien con los valores dopados. Se obtuvo una pendiente cercana a 1 (0,94) con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,989$.

5 Debido al interés en controlar la presencia de residuos de antibióticos en muestras de leche, se realizaron estudios para evaluar los potenciales efectos inespecíficos de la matriz. Los resultados revelaron que las muestras de leche no podían analizarse directamente mediante el ensayo desarrollado. Por lo tanto, se requirió la aplicación de factores de dilución de hasta 500 veces para eliminar la respuesta inespecífica observada
10 (Figura 2). Por esta razón, se evaluaron métodos de tratamiento simple con el objetivo de implementar este ensayo para un cribaje de alto rendimiento de muestras de leche. Como se observa en las figuras 2C y 2D, un procedimiento de precipitación sencillo con sulfato de amonio saturado o tampón McIlvaine, seguido por las correspondientes etapas de centrifugación y filtración, fue suficiente para minimizar las interferencias indeseadas. En
15 ambos casos, el efecto matriz con respecto al tampón PBS es casi negligible cuando el suero de leche se diluye 25 veces. Además, como puede observarse en las figuras 2C y 2D, la leche pudo medirse directamente con un factor de dilución más bajo, ya que el efecto de interferencia observado tras la precipitación de la proteína es muy bajo. Por lo tanto, al usar leche para preparar los estándares, las muestras de leche se podrían usar
20 sin diluir. Bajo estas condiciones, diluyendo la leche 25 veces, la LOD conseguida fue cercana a $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, que aún está bastante por debajo de los límites establecidos para la mayoría de las tetraciclinas cuyo uso está permitido en ganado destinado a la producción de leche para consumo humano, usualmente en el margen de 50 a $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ según tipo de tejido y especie animal. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos preliminares
25 dopando muestras de leche a varias concentraciones alrededor de los valores de LMR del resto de tetraciclinas, tratadas como se ha descrito anteriormente, y medidas con ELISA. La Tabla 4 muestra que los resultados obtenidos se corresponden muy bien con los valores de concentración dopada.

Tabla 4. Estudio de precisión realizado en PBST y en muestras de suero de leche ^a.

DC añadida	PBST			Suero de leche (1/25)		
200	194,11	202,69	264,44	186,52	193,22	240,25
100	193,97	108,28	133,82	165,08	101,96	121,33
50	90,48	76,12	77,70	77,93	67,49	68,67
25	35,34	37,24	20,87	24,73	26,23	13,45

^a Correlación entre los valores de concentración de DC medidos y dopados (añadidos) ($\mu\text{g L}^{-1}$) en suero de leche y usando los valores de referencia del tampón. La línea de puntos
5 corresponde a una correlación perfecta (pendiente 1).

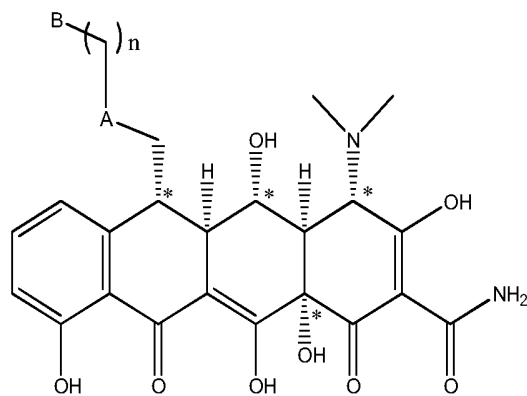
Las referencias bibliográficas mencionadas en la presente memoria descriptiva se listan a continuación:

- 10 [1] Riviere, J. E. and Spoo, J. W., Tetracycline Antibiotics In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th ed.; Adams, H. R., Ed.; Wiley-Blackwell: Iowa State, 2001, pp 828-840.
- [2] Kelly, M., Tarbin, J. A., Ashwin, H. and Sharman, M. Verification of compliance with organic meat production standards by detection of permitted and nonpermitted uses of
15 veterinary medicines (Tetracycline antibiotics). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 1523-1529.
- [3] Michalova, E., Novotna, P. and Schelegelova, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them (Review Article). *Vet. Med. – Czech* **2004**, *49*, 79-100.
- [4] Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T. The emergence and evolution of
20 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* **2001**, *9*, 486-493.
- [5] EC, Official Journal of the European Union: European Commission, Council Regulation 2377/90/EC (Consolidated version of MRLs updated to 08.07.2008 obtained from EMEA), 2008. <http://www.emea.europa.eu/htms/vet/mrls/a.htm>.
- [6] Link, N., Weber, W. and Fussenegger, M. A novel generic dipstick-based technology
25 for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples. *Journal of Biotechnology* **2007**, *128*, 668-680.
- [7] Alfredsson, G., Branzell, C., Granelli, K. and Lundstrom, A. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *529*, 47-51.

- [8] Pastor-Navarro, N., Morais, S., Maquieira, Á. and Puchades, R. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues: Application to honey samples. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *594*, 211-218.
- [9] Jeon, M. and Rhee Paeng, I. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626*, 180-185.
- [10] Zhang, Y. L., Lu, S. X., Liu, W., Zhao, C. B. and Xi, R. M. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 211-218.
- [11] Jeon, M., Kim, J., Paeng, K. J., Park, S. W. and Paeng, I. R. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. *Microchemical Journal* **2008**, *88*, 26-31.
- [12] Le, T., Yu, H., Guo, Y. C., Ngom, B., Shen, Y. A. and Bi, D. R. Development of an indirect competitive ELISA for the detection of doxycycline residue in animal edible tissues. *Food and Agricultural Immunology* **2009**, *20*, 111-124.
- [13] Nelson, M. L., Park, B. H., Andrews, J. S., Georgian, V. A., Thomas, R. C. and Levy, S. B. Inhibition of the tetracycline efflux antiport protein by 13-thio-substituted 5-hydroxy-6-deoxytetracyclines. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 370-377.
- [14] Galve, R., Camps, F., Sanchez-Baeza, F. and Marco, M. P. Development of an immunochemical technique for the analysis of trichlorophenols using theoretical models. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 2237-2246.
- [15] Gascón, J., Oubiña, A., Ballesteros, B., Barceló, D., Camps, F., Marco, M.-P., González-Martínez, M. A., Morais, S., Puchades, R. and Maquieira, A. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine Performance evaluation by flow injection immunoassay. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *347*, 149-162.
- [16] Blackwood, R. K., Beereboom, J. J., Rennhard, H. H., von Wittenau, M. S. and Stephens, C. R. 6-Methylenetetracyclines.1 I. A new class of tetracycline antibiotics. *JACS* **1961**, *83*, 2773-2775.
- [17] Blackwood, R. K., Beereboom, J. J., Rennhard, H. H., von Wittenau, M. S. and Stephens, C. R. 6-Methylenetetracyclines. III.1 Preparation and Properties2. *JACS* **1963**, *85*, 3943-3953.
- [18] Blackwood, R. K. and Stephens, C. R. 6-Methylenetetracyclines. II. Mercaptan Adducts. *JACS* **1962**, *84*, 4157-4159.

REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto de fórmula general (I) como hapteno:



(I)

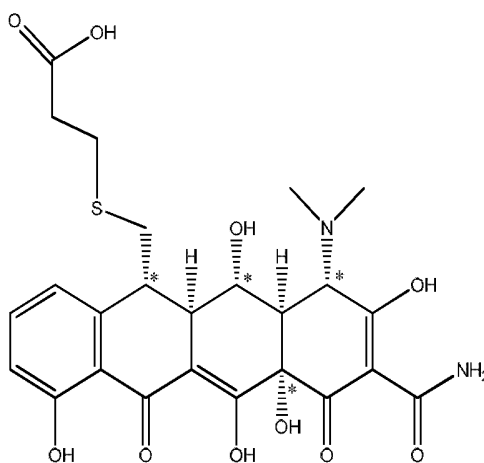
donde

A se selecciona entre S, O y NH;

10 B se selecciona entre $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, halógeno, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$; y

n es un entero seleccionado entre 1 y 6.

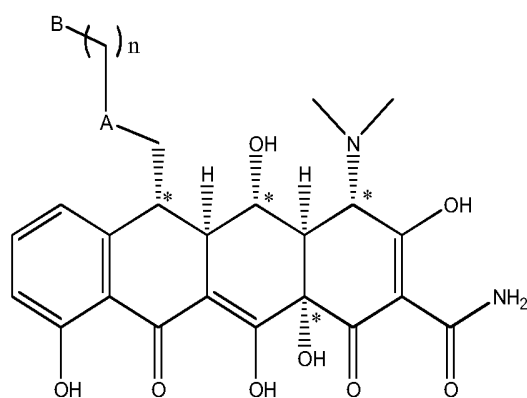
2. Uso de un compuesto según la reivindicación anterior en donde el compuesto presenta la fórmula (II):



(II)

51

3. Un compuesto de fórmula general (I):



5

(I)

donde

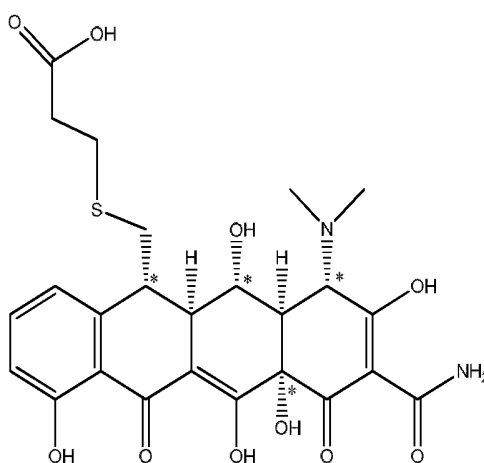
A se selecciona entre S, O y NH;

B se selecciona entre -COOH, -CHO, halógeno, -NH₂ y -SH; y

10

n es un entero seleccionado entre 1 y 6.

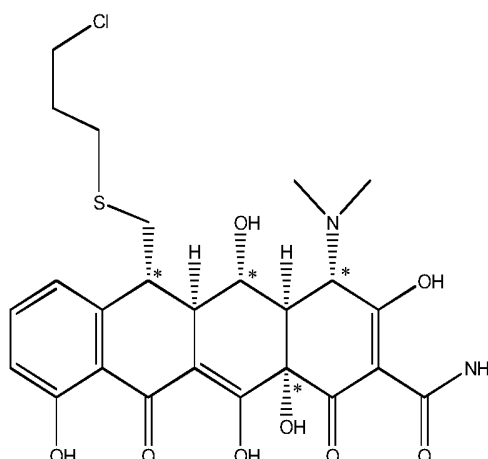
con la condición de que dicho compuesto no es



15

ni tampoco es

52



4. Conjugado que comprende un hapteno definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un segundo componente seleccionado del grupo de:
- 5 (a) una proteína transportadora o un fragmento de la misma que confiere antigenicidad,
 (b) un agente de marcaje detectable, y
 (c) un polímero o un soporte inorgánico
- 10 5. Conjugado según la reivindicación 4 donde el segundo componente es una proteína transportadora o un fragmento de la misma.
6. Conjugado según la reivindicación 5 donde la proteína transportadora es una proteína seleccionada del grupo consistente en hemocianina de molusco (HCH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina (OVA) y conalbúmina (CONA).
- 15 7. Conjugado según la reivindicación 6 que comprende un hapteno de fórmula (II) y donde la proteína transportadora es HCH.
- 20 8. Conjugado según la reivindicación 6 que comprende un hapteno de fórmula (II) y una proteína transportadora seleccionada de BSA, OVA y CONA.
9. Conjugado según la reivindicación anterior donde la proteína transportadora es OVA.
- 25 10. Conjugado según la reivindicación 4 donde el segundo componente es un agente de marcaje detectable.

11. Conjugado según la reivindicación 10 donde el agente de marcaje detectable se selecciona de un enzima, una sustancia luminiscente, una sustancia radioactiva, una sustancia fluorófora, nanopartículas o una mezcla de las mismas.
- 5 12. Conjugado según la reivindicación 11 donde el agente de marcaje detectable es la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP).
13. Conjugado según la reivindicación 11 donde el agente de marcaje detectable es una sustancia luminiscente seleccionada de una sustancia bioluminiscente, una sustancia quimioluminiscente y una sustancia fluorescente.
- 10
14. Método para la obtención de un conjugado definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13 que consiste en crear una unión covalente entre el hapteno y la proteína, o bien entre el hapteno y el agente de marcaje detectable, o bien entre el hapteno y el polímero o soporte inorgánico bien sea directamente o a través de un grupo de unión.
- 15
15. Método para la obtención de un conjugado según la reivindicación 14 en el que la unión covalente se realiza mediante un método de conjugación seleccionado del grupo consistente en el método del anhídrido mixto, el método del éster activo, la conjugación mediante halógenos y la conjugación mediante un aldehído.
- 20
16. Método según la reivindicación 15 donde cuando la proteína transportadora es HCH, el método de conjugación utilizado es el método del anhídrido mixto.
- 25
17. Método según la reivindicación 15 donde cuando la proteína transportadora se selecciona de BSA, OVA y CONA, o el agente de marcaje detectable es HRP el método utilizado es el método del éster activo.
- 30
18. Uso de un conjugado definido en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para la obtención de anticuerpos.
19. Uso según la reivindicación 18 en el que la obtención de anticuerpos comprende la administración de un conjugado definido en las reivindicaciones 5 a 7 y la recolección

del antisuero que contiene los anticuerpos séricos resultantes del animal inmunizado o de células tisulares de dicho animal capaces de producir dichos anticuerpos.

20. Anticuerpo obtenido por inmunización de un animal con un conjugado definido en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o un polipéptido que tenga al menos un fragmento de la secuencia de dicho anticuerpo con capacidad de unión al antígeno.
21. Anticuerpo según la reivindicación 20 donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
22. Anticuerpo según la reivindicación 21 donde dicho anticuerpo se ha obtenido por inmunización de un animal con un conjugado definido en la reivindicación 7.
23. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 en el que dicho anticuerpo está inmovilizado en un soporte sólido.
24. Método para la detección y/o cuantificación de doxiciclina o de un analito derivado de doxiciclina en una muestra que comprende el uso de un anticuerpo definido en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 o de un fragmento del mismo con capacidad de unión al antígeno.
25. Método según la reivindicación 24 donde, además, se utiliza un conjugado definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13.
26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25 donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo mediante un sistema seleccionado de biosensores e inmunoensayos.
27. Método según la reivindicación 26 donde el sistema es un inmunoensayo seleccionado de ELISA no competitivo indirecto y ELISA competitivo indirecto.
28. Método según la reivindicación 27 donde el inmunoensayo es un ELISA competitivo indirecto

29. Método según la reivindicación 28 donde el inmunoensayo comprende las siguientes etapas:

- 5 (a) inmovilizar un conjugado definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 en un soporte sólido,
- (b) eliminar el conjugado no inmovilizado,
- (c) añadir la muestra a analizar y un primer anticuerpo anti-doxiciclina definido en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 en el soporte sólido del apartado (a) en incubar,
- 10 (d) eliminar el primer anticuerpo no unido al conjugado,
- (e) añadir un segundo anticuerpo conjugado con un agente de marcaje detectable, reconociendo dicho segundo anticuerpo al primer anticuerpo e incubar,
- (f) eliminar el segundo anticuerpo no unido al primer anticuerpo, y
- 15 (g) detectar y/o cuantificar el complejo obtenido según el apartado (e) con una composición que contiene un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

30. Método según la reivindicación 29 donde la etapa (c) se realiza en presencia de un tampón que comprende iones calcio.

20

31. Método según la reivindicación 30 donde la etapa (c) se realiza en presencia de un tampón que tiene las siguientes características:

- i. una concentración de detergente no iónico inferior a 0,010%,
- ii. un pH comprendido entre 4 y 9,
- 25 iii. una conductividad comprendida entre 10 y 70 mS/cm; y
- iv. una concentración de iones Ca^{2+} comprendida entre 0,1 y 2,0 mM.

32. Método según la reivindicación 31 donde el tampón tiene las siguientes características:

- i. una concentración de detergente no iónico de 0,001%,
- 30 ii. un pH de 5,5,
- iii. una conductividad de 32 mS/cm; y
- iv. una concentración de iones Ca^{2+} de 1mM.

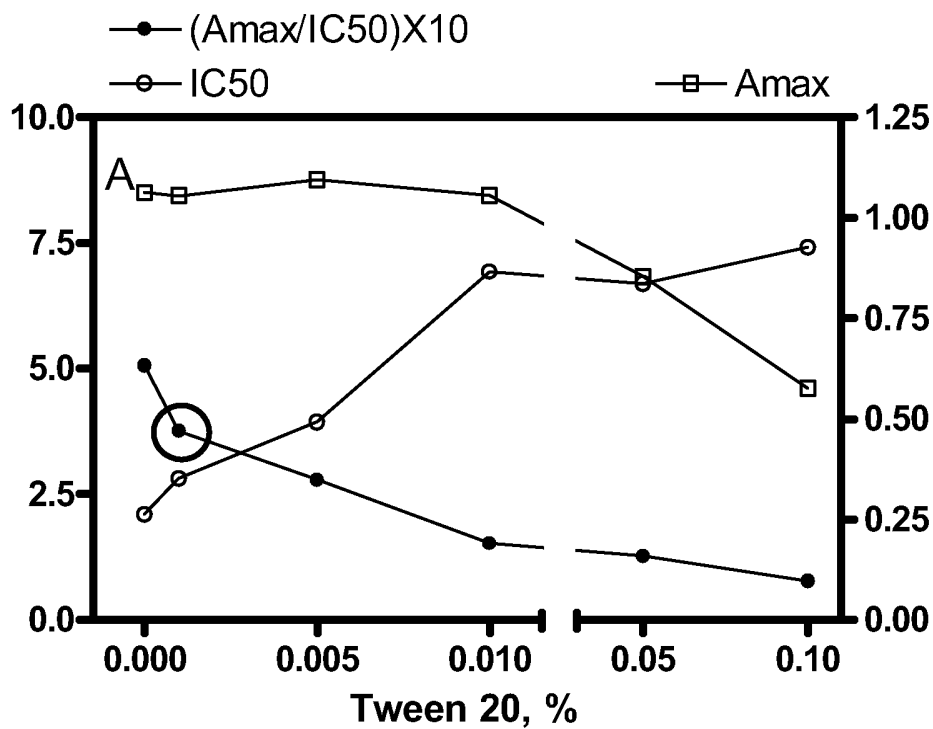
33. Método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 donde la muestra a analizar y el primer anticuerpo de la etapa (c) han sido pre-incubados antes de añadirlos al soporte sólido.
- 5 34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 donde la muestra a analizar y el primer anticuerpo de la etapa (c) se han añadido al soporte sólido sin pre-incubación.
35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 34 donde la muestra a analizar se selecciona de una muestra alimentaria, clínica y medioambiental.
- 10 36. Método según la reivindicación anterior donde la muestra medioambiental es una muestra seleccionada de agua y suelo.
37. Método según la reivindicación 35 donde la muestra es alimentaria.
- 15 38. Método según la reivindicación 37 donde la muestra alimentaria es leche.
39. Método según la reivindicación 38 donde la muestra de leche es suero de leche obtenido mediante un pre-tratamiento de la leche que comprende:
- 20 (iv) precipitación con un agente seleccionado de sulfato de amonio saturado y tampón Mc Ilvaine,
(v) centrifugación del precipitado obtenido; y
(vi) filtración para separar el suero de leche del precipitado.
- 25 40. Método según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 39 donde dicho método se utiliza en cribaje de alto rendimiento de muestras de leche.
41. Método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 40 donde el conjugado utilizado en la etapa (a) es un conjugado definido en la reivindicación 9.
- 30 42. Método según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 41 donde el anticuerpo utilizado es un anticuerpo definido en la reivindicación 22.
43. Kit para la detección y/o cuantificación de doxiciclina o de un analito derivado de doxiciclina en una muestra que comprende al menos un conjugado definido en
- 35

cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 y al menos un anticuerpo anti-doxiciclina definido en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23.

44. Kit según la reivindicación 43 que además comprende al menos un anticuerpo contra los anticuerpos anti-doxiciclina.
- 5

DIBUJOS

A)



B)

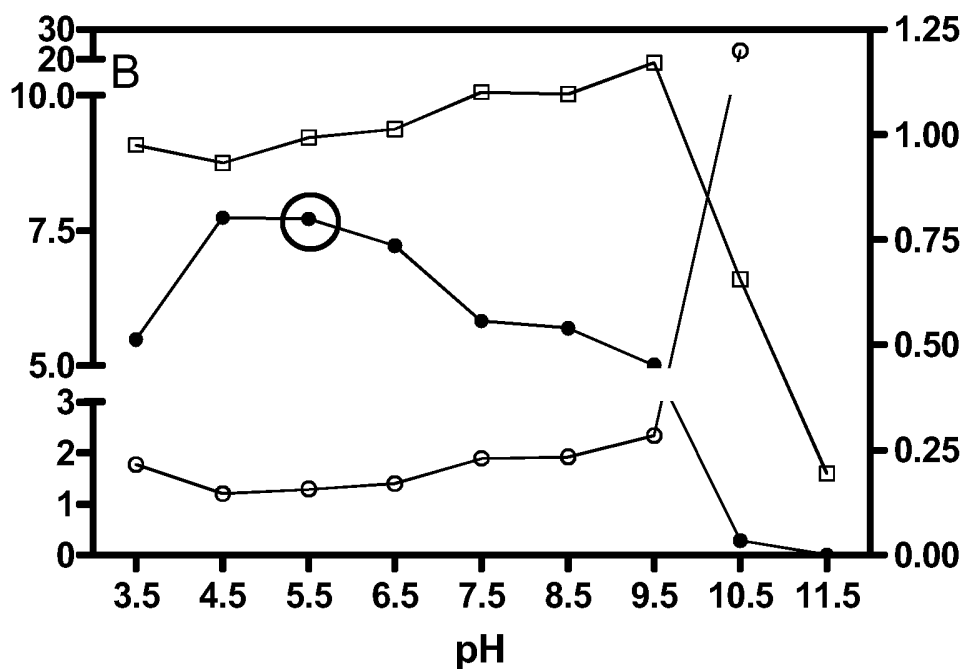
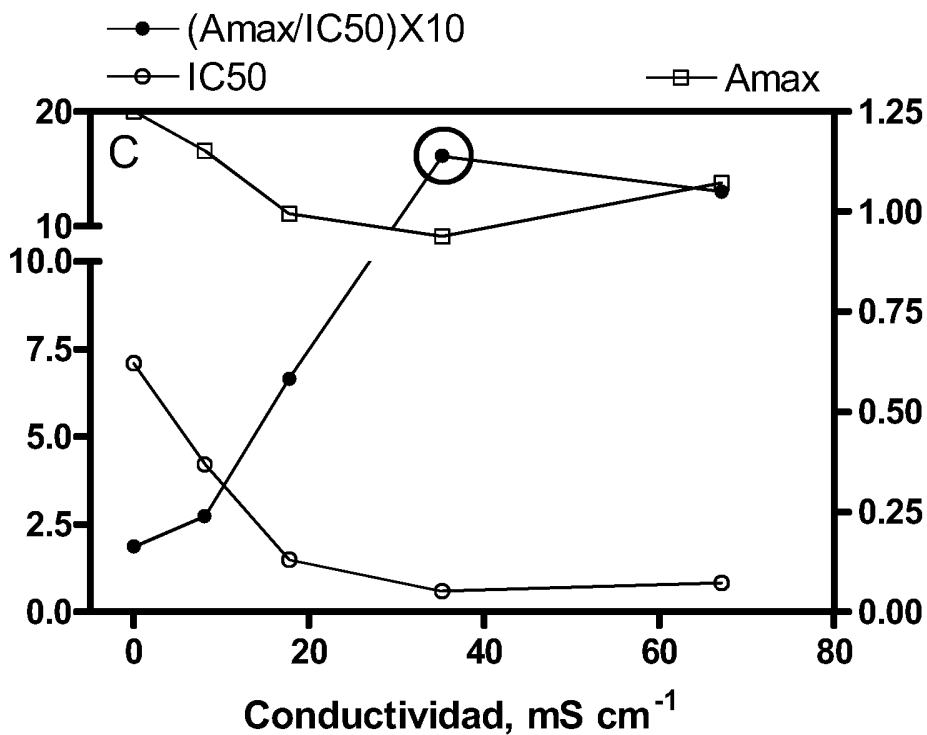


FIGURA 1

c)



d)

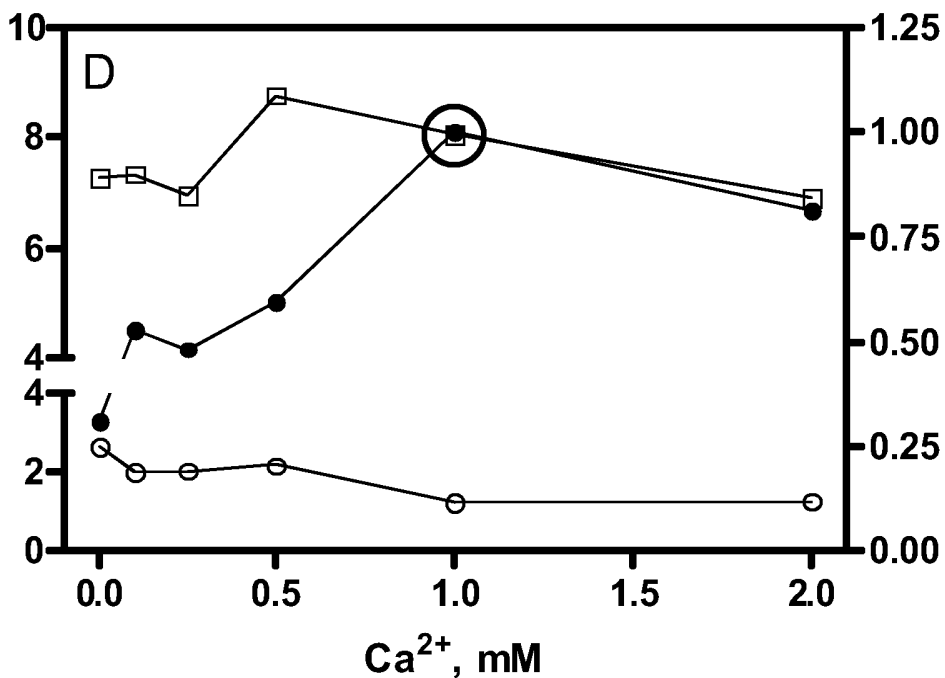
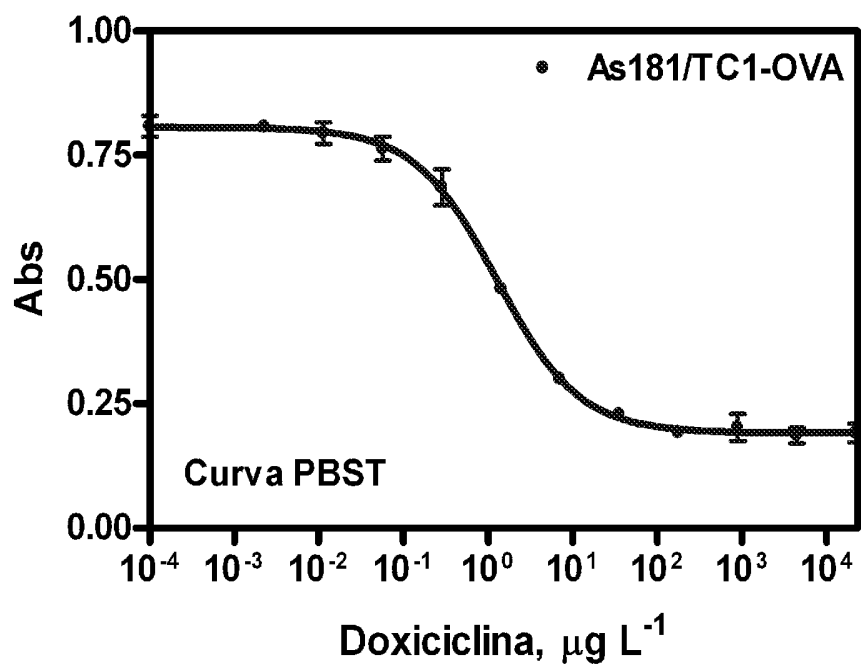


FIGURA 1

A)



B)

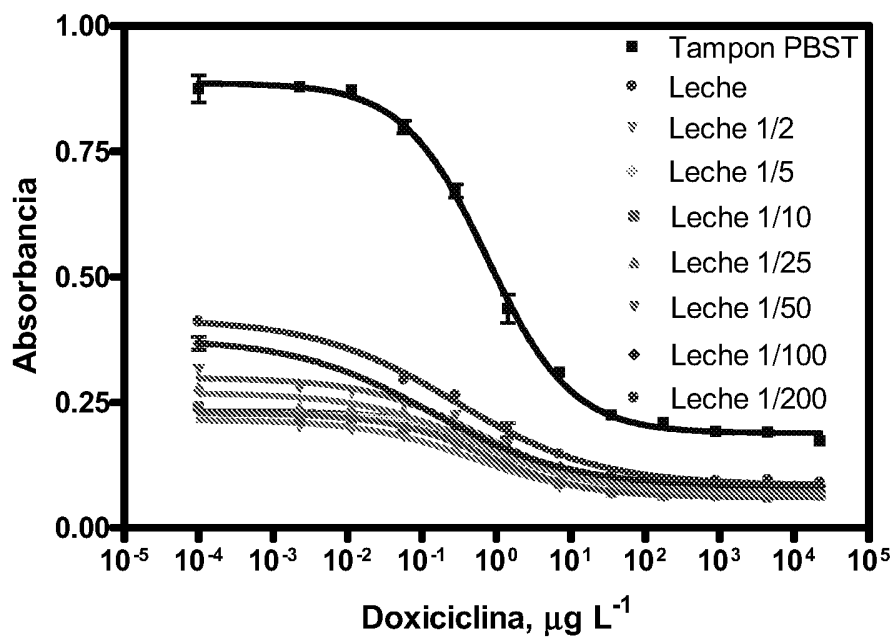
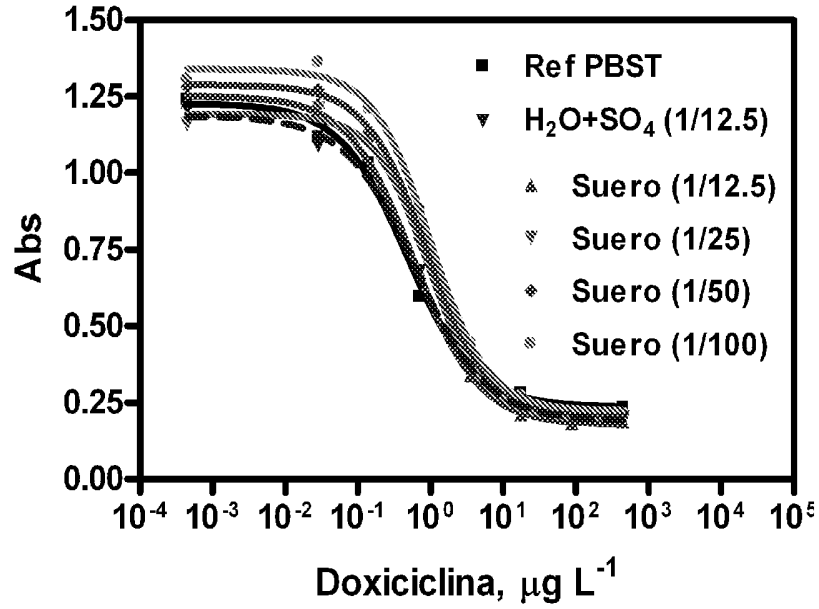


FIGURA 2

C)



D)

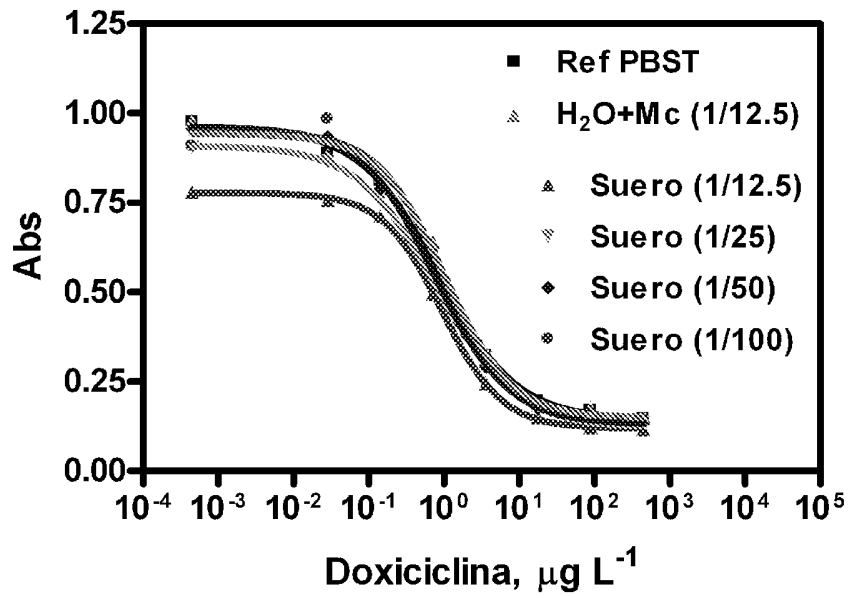


FIGURA 2

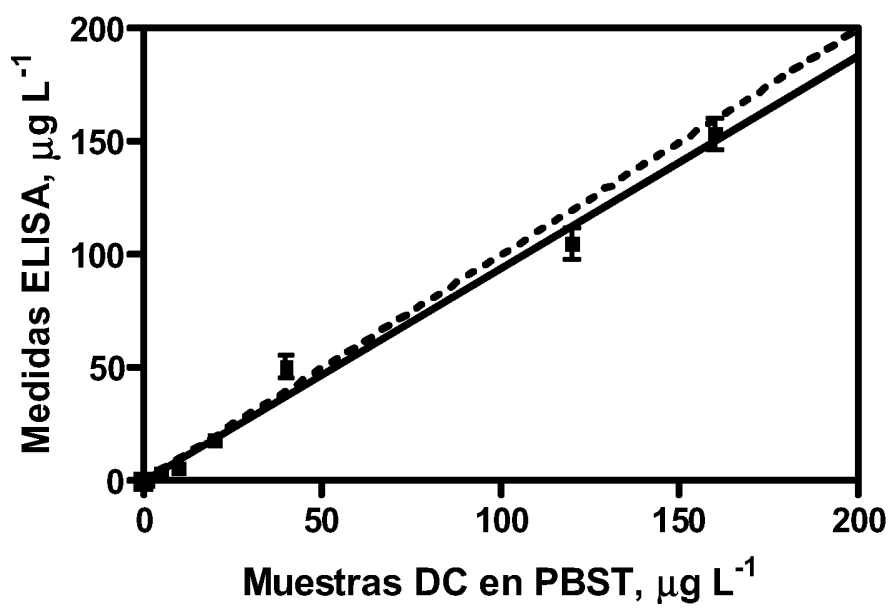


FIGURA 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C07C, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASES, NPL, XPESP, EXPESP2, REGISTRY

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2356559T T3 (ETAT FRANSAIS REPRESENTE PAR LE DELEGUE GENERAL POUR L ARMEMENT) 11/04/2011, Example, claims.	1-44
A	11/12/2007, JEON et al. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. MICROCHEMICAL JOURNAL, 20071211 NEW YORK, NY, US 11/12/2007 VOL: 88 No: 1 Pags: 26 - 31 ISSN 0026-265X Doi: doi:10.1016/j.microc.2007.09.001, the whole the document.	1-44

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
26/06/2013

Date of mailing of the international search report
(01/07/2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
H. Aylagas Cancio

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070155

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	02/07/2007, PASTOR-NAVARRO et al. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. ANALYTICA CHIMICA ACTA, 20070702 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 02/07/2007 VOL: 594 No: 2 Pags: 211 - 218 ISSN 0003-2670 Doi: doi:10.1016/j.aca.2007.05.045, the whole document.	1-44
A	01/04/1981, FARAJ B A et al. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 19810401 American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, US 01/04/1981 VOL: 217 No: 1 Pags: 10 - 14 ISSN 0022-3565 , the whole document	1-44
A	24/01/2007, ZHANG YULAN et al. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk.. Journal of agricultural and food chemistry United States 24 Jan 2007 24/01/2007 VOL: 55 No: 2 Pags: 211 - 218 ISSN 0021-8561 (Print) Doi: pubmed:17227044, the whole document	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070155

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2356559T T3	11.04.2011	EP1798241 A1 EP1798241 B1 AT496065T T FR2894583 A1 FR2894583 B1	20.06.2007 19.01.2011 15.02.2011 15.06.2007 26.11.2010
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070155

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/65 (2006.01)
A61K47/48 (2006.01)
C07C237/48 (2006.01)
C07K16/06 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070155

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, C07C, C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASES, NPL, XPESP, EXPESP2, REGISTRY

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ES 2356559T T3 (ETAT FRANSAIS REPRESENTE PAR LE DELEGUE GENERAL POUR L ARMEMENT) 11/04/2011, Ejemplo, reivindicaciones.	1-44
A	JEON et al. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. MICROCHEMICAL JOURNAL, 20071211 NEW YORK, NY, US 11/12/2007 VOL: 88 No: 1 Pags: 26 - 31 ISSN 0026-265X Doi: doi:10.1016/j.microc.2007.09.001, todo el documento.	1-44

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
26/06/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
01 de julio de 2013 (01/07/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
H. Aylagas Cancio

Nº de teléfono 91 3498563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/070155

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	<p>PASTOR-NAVARRO et al. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues. ANALYTICA CHIMICA ACTA, 20070702 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 02/07/2007 VOL: 594 No: 2 Pags: 211 - 218 ISSN 0003-2670 Doi: doi:10.1016/j.aca.2007.05.045, todo el documento.</p>	1-44
A	<p>FARAJ B A et al. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 19810401 American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, US 01/04/1981 VOL: 217 No: 1 Pags: 10 - 14 ISSN 0022-3565 , todo el documento</p>	1-44
A	<p>ZHANG YULAN et al. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk.. Journal of agricultural and food chemistry United States 24 Jan 2007 24/01/2007 VOL: 55 No: 2 Pags: 211 - 218 ISSN 0021-8561 (Print) Doi: pubmed:17227044, todo el documento</p>	1-44

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070155

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2356559T T3	11.04.2011	EP1798241 A1	20.06.2007
		EP1798241 B1	19.01.2011
		AT496065T T	15.02.2011
		FR2894583 A1	15.06.2007
		FR2894583 B1	26.11.2010
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K31/65 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

C07C237/48 (2006.01)

C07K16/06 (2006.01)