



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 341 523**

② Número de solicitud: 200803612

⑤ Int. Cl.:

C07C 57/58 (2006.01)

C07C 233/51 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **18.12.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.06.2010

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Marco Colás, María del Pilar;**
Sánchez-Baeza, Francisco José y
Ramón Azcón, Javier

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Haptenos, usos y método inmunoquímico para la detección de bromopropilato.**

⑤ Resumen:

Haptenos, usos y método inmunoquímico para la detección de bromopropilato.

La presente invención se refiere a varios haptenos derivados de bromopropilato (BP), sus usos para la síntesis de inmunoreactivos así como un método inmunoquímico para la detección y/o cuantificación de bromopropilato (BP) y sus respectivos kits. La estructura química de los haptenos empleados, tanto para la inmovilización en el soporte sólido como para la inmunización de animales para obtener los respectivos anticuerpos policlonales, se ha diseñado para maximizar el reconocimiento del grupo bis-bromofenil del BP por parte de los anticuerpos generados. El método de la presente invención se refiere a un análisis inmunoquímico indirecto capaz de detectar BP con un umbral de $0.14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y pesticidas relacionados que contienen un grupo bis-halofenil en su estructura. Además, el BP se puede analizar directamente en muestras de vino.

ES 2 341 523 A1

DESCRIPCIÓN

Haptenos, usos y método inmunoquímico para la detección de bromopropilato.

5 La presente invención se refiere a varios haptenos derivados de bromopropilato (BP), sus usos para la síntesis de inmunoreactivos así como un método inmunoquímico para la detección y/o cuantificación de bromopropilato (BP) y sus respectivos kits. La estructura química de los haptenos empleados, tanto para la inmovilización en el soporte sólido como para la inmunización de animales para obtener los respectivos anticuerpos policlonales, se ha diseñado para maximizar el reconocimiento del grupo bis-bromofenil del BP por parte de los anticuerpos generados. El método
10 de la presente invención se refiere a un análisis inmunoquímico indirecto capaz de detectar BP con un umbral de 0.14 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y pesticidas relacionados que contienen un grupo bis-halofenil en su estructura. Además, el BP se puede analizar directamente en muestras de vino.

Estado de la técnica anterior

15 En los últimos años se viene detectando la presencia de residuos de pesticidas en frutas y verduras. El consumo de estos alimentos supone un claro peligro potencial sobre los seres humanos y el ambiente.

El bromopropilato (BP) es un miticida de contacto que se ha utilizado extensivamente en agricultura contra todas las etapas del ciclo de vida de los ácaros, por ejemplo, de las familias Eriophyidae, Tenuipalpidae o de Tetranychidae. El BP es un compuesto no sistémico y no penetrante que permanece en la cáscara de frutas y no emigra en la pulpa. Por otra parte, el BP es bastante persistente en el ambiente en medios ácidos (50 días de vida media) y neutrales (más de 3 años de vida media). El BP tiene toxicidad aguda baja en las ratas y los conejos. Sin embargo, los efectos del BP sobre seres humanos son desconocidos. El INCHEM (*International programme on chemical safety*) establece una ingesta diaria aceptable de entre 0-0.03 mg/kg en seres humanos. El BP fue probado en primer lugar en 1966 para el control de ácaros. Hoy en día, el uso de BP ha sido prohibido en el Reino Unido. En varios Estados de la Unión Europea se permite mantener el uso autorizado de BP hasta 2008, mientras que se buscan alternativas (regulación 2076/2002/EC). El nivel de residuo máximo temporal (MRLs) en productos tales como uvas para vinificación, cítricos y manzanas (2 mg·Kg⁻¹) se ha establecido de acuerdo con la Directiva 90/642/EEC. Sin embargo, los datos de la
20 Comisión Europea demuestran que todavía hay un uso continuo de BP en viñedos ya que se han encontrado residuos de BP en Noruega, Islandia, Dinamarca, Italia y Lichtenstein en uvas de mesa con los niveles de residuo que excedían los MRLs (COMMUNITIES, C. O. T. E., *Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland, Denmark, Italy and Liechtenstein*. En DOCUMENT, C. S. W., Ed. 2005).

25 El procedimiento clásico usado para detectar y/o para cuantificar este tipo de compuestos incluye su extracción y separación de otras sustancias potencialmente de interferencia de la muestra biológica y la cuantificación posterior por análisis instrumental. Aunque los métodos analíticos convencionales ofrecen límites de detección a nivel de partes por billón (ppb), requieren de instrumentación cara y personal especializado para poder llevar a cabo las detecciones y/o cuantificaciones. Además, este tipo de métodos pueden sufrir pérdidas en la recuperación del compuesto que se desea
30 analizar.

Para garantizar la calidad de la fruta y verdura, se analiza el BP mediante técnicas cromatográficas tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (Martel y Zeggane (2002). *J. Chromatog. A.* 954(1-2): 173-180), cromatografía de gas (Lee y Kennedy (2001). *J. AOAC Int.* 84(5): 1393-1406) o cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (Liapis *et al.* (2003). *J. Chromatog. A.* 996(1-2):181-187). Estas técnicas tienen límites de detección alrededor de los MRLs. Sin embargo, una desventaja importante de estos procedimientos es que requieren un método de extracción complejo tal como extracción líquida, sólido-fase o microextracción sólido-fase antes del análisis. Consecuentemente, las técnicas cromatográficas requieren un tiempo considerable, el instrumental necesario es caro y el personal debe estar muy especializado.
35

Se han desarrollado inmunoensayos para la detección de pesticidas y otros agentes contaminantes ambientales, tales como insecticidas organofosforados (Lee *et al.* (1995). *J. Agric. Food Chem.* 43(6): 1730-1739). No obstante, hasta el presente, no existe ningún método ni los reactivos necesarios para la detección de BP mediante inmunoensayos. Para conseguirlos se requiere un complejo y no descrito proceso de síntesis de aquellos derivados que puedan presentarse en la naturaleza de forma que se puedan detectar de forma específica y con un bajo umbral de detección.
40

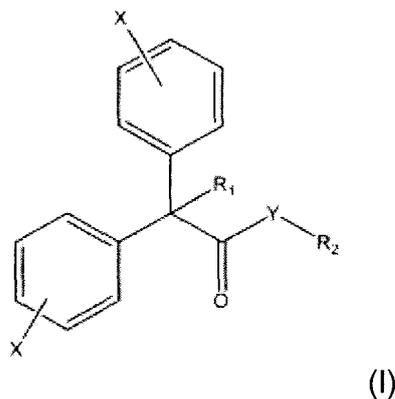
Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un conjunto de haptenos estructuralmente relacionados, desde el punto de vista químico, con el bromopropilato (BP) y otros compuestos de esta familia de pesticidas y sus intermedios de síntesis y de degradación medioambiental, sus usos para la síntesis de inmunoreactivos así como un método inmunoquímico para la detección y/o cuantificación de bromopropilato (BP). El método de la presente invención está basado en la síntesis de derivados de BP (en adelante, haptenos) y anticuerpos policlonales específicos. La estructura química de los haptenos empleados, tanto para la inmovilización en el soporte sólido como para la inmunización de animales para obtener los respectivos anticuerpos policlonales, fue diseñada para maximizar el reconocimiento del grupo bis-halofenilmetileno del BP. Para producir respuesta inmunológica en el animal, se conjugaron los diferentes haptenos sintetizados a diversas proteínas. Por tanto, el método de la presente invención se refiere a la detección y/o cuantificación inmunológica indirecta capaz de detectar BP con un umbral de 0.14 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Los estudios en la selectividad de este inmunoensayo
45

ES 2 341 523 A1

han demostrado un alto reconocimiento de los pesticidas relacionados que contienen un grupo bis-halofenilmetilen en su estructura. Otros pesticidas no interfieren en el análisis de BP usando esta técnica inmunoquímica. Además, tal como se demuestra en el ejemplo correspondiente, el BP se puede analizar directamente en muestras de vino sin la necesidad de un procedimiento de limpieza de aplicar el método.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un hapteno de bromopropilato (BP) de fórmula general I



Donde

X es un halógeno seleccionado de entre Cl, Br, I ó F;

R₁ se selecciona de entre Cl, Br, OH ó O-(CH₂)_n-R_g;

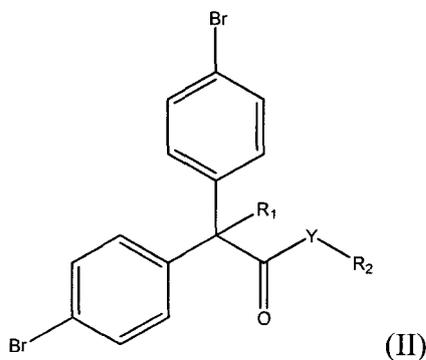
Y es O ó NH y

cuando Y es O, R₂ es H o alquilo (C₁-C₄) y

cuando Y es NH, R₂ es -(CH₂)_n-R_g;

donde n toma valores de entre 2 a 4 y R_g se selecciona de entre OH, CHO, COOH, NH₂ o SH. Cuando R₁ es O-(CH₂)_n-R_g, R_g también puede ser -OCOCH₂I.

En la presente invención se entiende por “halógeno” un átomo de Bromo (Br), Cloro (Cl), yodo (I) o flúor (F). Preferiblemente el halógeno es Br y más preferiblemente, en el hapteno de fórmula general (I), el halógeno(X) es Br. Los sustituyentes de los arilos (X) están preferiblemente situados en posición para de ambos anillos. Por lo que preferiblemente, los haptenos de la presente invención presentan la fórmula general (II):



El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono. Más preferiblemente es metilo o isopropilo (i-propilo).

ES 2 341 523 A1

Según otra realización preferida, Y es O y R₂ es un grupo metil o isopropilo.

En otra realización preferida, Y es NH y R₂ es -(CH₂)₃-COOH.

5 Según una realización preferida, el hapteno de BP se selecciona de la lista que comprende:

- ácido 2,2-bis(4-bromofenil)-N-2-hidroxiacetamida-butanoico,
- ácido 4-(2,2-bis(4-bromofenil)-2-cloroacetamido)butanoico,
- 10 • 2-iodoacetato de propilo 3-((isopropoxycarbonil)bis(4-bromofenil)metoxi),
- acetato de isopropil 2-(2-formiletoxi)-2,2-bis(4-bromofenil), o
- 15 • acetato de metil 2-(2-formiletoxi)-2,2-bis(4-bromofenil).

Un hapteno es un compuesto químico que, cuando ingresa en un cuerpo animal, no induce por sí mismo la formación de anticuerpos debido a su pequeño tamaño pero, cuando está unido covalentemente a una proteína el complejo resultante es capaz de estimular una respuesta inmunitaria. En resumen un hapteno es la parte de un antígeno que por sí sola no dispara respuesta inmune, pero sí induce la especificidad deseada en la respuesta inmune. Preferentemente el hapteno puede unirse de forma covalente a los grupos lisina de las proteínas mediante los grupos aldehído o los grupos carboxilo.

20 El hapteno de la presente invención es un compuesto análogo estructuralmente al analito presente en la muestra. El hapteno ideal es aquel que preserva la mayoría de las características esféricas y electrónicas del compuesto y mimetiza la geometría espacial de la estructura química lo máximo posible.

Según otra realización preferida, el hapteno de BP se conjuga con una proteína o un polímero. El polímero al que permanece conjugado el hapteno de BP de la presente invención puede ser, pero sin limitarse, el dextrano (simple o modificado), polipirrol, polianilina (heteropolímeros con monoceros que soportan funcionalidades reactivas) o polilisina.

30 Según otra realización más preferida el hapteno de BP está conjugado con una proteína que se selecciona de la lista que comprende hemocianina de molusco (por ejemplo, HCH o KLH), seroalbúmina (por ejemplo, BSA, RSA), ovalbúmina (OVA) o conalbúmina (CONA).

Tal como se entiende en la presente invención, el hapteno conjugado a una proteína se denomina antígeno si el objetivo de ese compuesto es unirse a los anticuerpos específicos contra el analito o inmunógeno si se utiliza para desencadenar la respuesta inmunológica en un organismo animal. Preferiblemente la proteína tiene una masa molecular relativa mayor de 15 KDa y procede de un animal distinto del animal que se desea inmunizar (según se describe más adelante). Las proteínas se unen al hapteno por medio de los aminoácidos de su capa exterior y aminoácidos accesibles con cadenas laterales de tipo nucleófilo, es decir, las proteínas tienen, al menos, un aminoácido reactivo que se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, cisteína, serina, tirosina o lisina.

45 Otro aspecto de la presente invención es el uso de cualquiera de los haptenos descritos, conjugados o no con una proteína o polímero tal como se ha descrito en los párrafos anteriores, para la síntesis de inmunoreactivos. Los de competición para las técnicas inmunoquímicas de detección.

Según una realización más preferida del uso del hapteno de BP, el inmunoreactivo se selecciona de la lista que comprende inmunógeno, antisuero, anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, antígeno, trazadores para inmunoensayos o trazadores para inmunosensores.

55 El término “inmunoreactivos” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier molécula que pueda ser empleada en ensayos inmunoquímicos. El inmunógeno es cualquier conjugación de cualquiera de los haptenos según el primer aspecto de la presente invención con una proteína de forma que genere una respuesta inmunológica en el animal en el que ingresa el antígeno o para unir específicamente los anticuerpos selectivos generados en cuyo caso se denomina antígeno o competidor. El antisuero es el suero que se obtiene de la sangre de un animal que contiene una mezcla de anticuerpos que son sintetizados como consecuencia del ingreso del hapteno conjugado con una proteína en el cuerpo del animal. El anticuerpo es la inmunoglobulina que el animal ha sintetizado de forma específica contra el hapteno conjugado con una proteína y que está libre de restos de componentes del suero. El competidor es un hapteno análogo al analito presente en la muestra que se desea detectar y/o cuantificar y que es empleado en el método de detección y/o cuantificación de un analito derivado de BP tal como se describe más adelante.

65 Otro aspecto de la presente invención es un método para la detección y/o cuantificación en una muestra de BP o de un analito derivado de BP que comprende:

- a. Inmovilizar un hapteno tal y como se ha descrito anteriormente (antígeno) en un soporte sólido,

ES 2 341 523 A1

- b. mezclar la muestra y un anticuerpo o antisuero anti-antígeno en el soporte sólido del apartado (a) para formar un primer complejo,
- c. añadir un segundo anticuerpo marcado al complejo formado según el apartado (b) para formar un segundo complejo y
- d. detectar y/o cuantificar el segundo complejo obtenido según el apartado (c) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

El término “soporte sólido” tal como se entiende en la presente invención, se refiere a una gran variedad de materiales, como por ejemplo, la resina de intercambio iónico o adsorción, el vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres de celulosa, esferas paramagnéticas o la combinación de algunos de ellos, pero sin limitarse a los materiales mencionados anteriormente. Preferiblemente el material del soporte sólido es plástico y el soporte son placas estándar para análisis ELISA.

La inmovilización del antígeno en la superficie de un soporte como el plástico de poliestireno es dirigido por la química de la superficie. Hay muchos factores que pueden modificar la capacidad de inmovilización de los antígenos. El tiempo y la temperatura de incubación son muy importantes. Generalmente a mayor temperatura menos tiempo de incubación es necesario pero es preferible utilizar una temperatura de entre 3 y 6°C durante un tiempo de entre 10 y 20 horas para inmovilizar los antígenos a la superficie del soporte sólido.

El paso de inmovilización de un antígeno incluye el bloqueo de los espacios del soporte que no hayan sido ocupados por los antígenos 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.

El anticuerpo o antisuero marcado tal como se entiende en la presente invención es un anticuerpo 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. Un ejemplo de compuesto susceptible de ser detectado es la enzima peroxidasa. 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 sustratos. En el caso de emplear un sustrato cromogénico, la presencia 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 a los anticuerpos Ac1 y su cuantificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de espectrofotometría. Si se emplea un sustrato fluorogénico 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.

Una realización preferida del método de detección y/o cuantificación comprende:

- a. Inmovilizar un hapteno según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 (antígeno) en un soporte sólido.
- b. añadir la muestra y anticuerpos anti-antígeno (Ac1) preincubados, al antígeno inmovilizado del apartado (a) e incubar,
- c. añadir anticuerpos anti-Ac1 (Ac2) conjugados con una enzima, a los anticuerpos Ac1 del apartado (b) e incubar,
- d. lavar después de cada uno de los pasos (a), (b) y (c),
- e. añadir un sustrato de la enzima al producto obtenido en el apartado (c) e incubar,
- f. medir la absorbancia del producto obtenido en el apartado (e) y
- g. comparar la absorbancia medida en el apartado (f) con la absorbancia del control y determinar la concentración del analito de la muestra.

Después de la inmovilización del antígeno del apartado (a), se añade la muestra y anticuerpos anti-antígeno (Ac1) preincubados, al antígeno inmovilizado del apartado (a) e incubar. La muestra contiene el hapteno que se desea detectar. Los anticuerpos Ac1 se obtienen tal como se describe en el ejemplo correspondiente. La obtención de los Ac1 comprende; Conjuguar un hapteno de fórmula general I con una proteína, introducir el producto obtenido de la conjugación en un animal y obtener los anticuerpos producidos por el animal. Preferiblemente el animal es un conejo.

La preincubación consiste en mezclar la muestra y anticuerpos anti-antígeno (Ac1) durante un tiempo determinado, preferiblemente menos de 30 minutos, a una temperatura de entre 20 y 40°C. Con incubaciones de más de 30 minutos no se mejoran los resultados. La mezcla preincubada se añade al antígeno inmovilizado en el soporte sólido y se incuba en las mismas condiciones que la preincubación durante un tiempo de entre 5 y 60 minutos. De esta manera se consigue la unión de Ap1 y los haptenos de la muestra, reconocidos por los anticuerpos, a los antígenos inmovilizados en el soporte.

ES 2 341 523 A1

Después se añaden anticuerpos anti-Ac1 (Ac2) conjugados con una enzima, a los anticuerpos Ac1 del apartado (b) y se incuban. Los anticuerpos Ac2 se obtienen en un animal diferente del que se ha empleado para producir los anticuerpos Ac1 mediante la introducción de anticuerpos Ac1 en el animal y la obtención de los anticuerpos anti-Ac1 producidos por el animal. Preferiblemente el animal es una cabra. Los anticuerpos Ac2 se incuban el complejo antígeno-hapteno de la muestra-Ac1 inmovilizado en el soporte sólido y se incuban en las mismas condiciones descritas para el paso anterior del método. Los anticuerpos Ac2 se conjugan con un enzima.

Los anticuerpos Ac2 están unidos (mediante conjugación) con una enzima. La enzima es capaz de reaccionar con un sustrato de forma que se derive de ello una detección cromogénica, fluorogénica y/o quimioluminiscente. Preferiblemente la detección es cromogénica. Preferiblemente la enzima es peroxidasa y el sustrato es 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Después de cada uno de los pasos anteriores (a), (b) y (c) se llevan a cabo lavados. Se llevan a cabo entre 1 y 10 lavados. Preferiblemente se hacen de entre 2 a 5 lavados. Los lavados tienen la finalidad de eliminar todos aquellos haptenos, anticuerpos, etc., que no se hayan inmovilizado o unido a los antígenos inmovilizados, de forma que todo aquello que sea detectado sea específico y deseado. Los lavados se hacen preferiblemente con una solución de tampón fosfato PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 10 mM, con una solución salina con una concentración del 0,8% (P/V) y pH de 7,5. Además, los lavados pueden hacerse mediante tampón PBST, es decir, tampón PBS con Tween 20 un detergente no-iónico, al 0,05%. En el caso de usar PBST se bloquean de forma continua los posibles espacios libres en el soporte sólido.

A continuación se añade un sustrato de la enzima al producto obtenido en el apartado (c) y se incuban. La presencia del hapteno objeto de la presente invención se evidencia por la aparición de un color cuya intensidad varía directamente con el número de moléculas de hapteno presentes en la muestra, unidas a los anticuerpos específicos. Si se emplea un sustrato fluorogénico 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.

La reacción enzimática es inhibida pasado un tiempo desde que se añadió el sustrato, para ello, se cambian las condiciones óptimas de funcionamiento de la enzima que se esté utilizando.

Cuando la reacción enzimática ya ha tenido lugar, se mide la absorbancia del producto obtenido en el apartado (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 la comparación con curvas de referencia de medidas tomadas con patrones a diferentes concentraciones conocidas del analito que se desea detectar y/o cuantificar en la muestra.

Se debe comparar la absorbancia medida en el apartado (f) con la absorbancia del control y determinar la concentración del analito de la muestra. El control es un conjunto de soluciones que contiene el analito que se desea detectar y/o cuantificar en la presente invención, a concentraciones conocidas, de modo que los valores de absorbancia y los valores de 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 del analito presente en la muestra son cuantificadas interpolando los valores de absorbancia en la recta de calibrado o recta de regresión lineal.

Otra realización preferida es el método en el que la muestra es vino. Más preferiblemente el vino es vino blanco. Debido a la complejidad de la muestra de vino tinto (mayor número de componentes que el vino blanco), la detección y/o cuantificación de los haptenos se puede llevar a cabo con diluciones de, por ejemplo 1/40.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para la detección y/o cuantificación en una muestra de de BP o de un analito derivado de BP que comprende, anticuerpos Ac1 y, al menos, un hapteno según se ha descrito en el primer aspecto de la presente invención o cualquiera de sus realizaciones.

Según una realización preferida, el kit comprende además anticuerpos Ac2.

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

60 Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la avidéz de los antisueros por los conjugados competidores.

Eje X: competidores. Cada una de los haptenos 2, 4, 7 y 9 se conjugan con las proteínas BSA, CONA u OVA.

2-HCH es el hapteno 2 conjugado con la proteína HCH.

6-HCH es el hapteno 6 conjugado con la proteína HCH.

ES 2 341 523 A1

La figura representa las absorbancias detectadas al utilizar los antisueros As174 a 179 y los respectivos competidores. Se utiliza una dilución 1/2000 de antisueros y una concentración de competidor de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5 Fig. 2. Muestra el efecto del tiempo de preincubación, concentración de detergente, pH y conductividad y el IC50 de los inmunoensayos.

10 Fig. 3. Muestra la curva de calibración de la respuesta del inmunoensayo optimizado 9-BSA/As174 dependiente de la concentración de bromopropilato (BP).

15 Fig. 4. Muestra la correlación lineal entre la concentración de BP medida y la concentración de BP añadida a muestras fortificadas con una cantidad conocida del compuesto.

20 Fig. 5. Muestra el efecto de la cantidad de etanol añadido a la muestra de calibración sobre la absorción máxima y el IC50 del inmunoensayo 9-BSA/As174.

Fig. 6. Muestra la Interferencia de las muestras de vino blanco y vino tinto sobre el inmunoensayo 9-BSA/As174 en función de la dilución de la muestra.

25 Las curvas representan los valores relativos a la absorbancia de una muestra de vino blanco (WW), una dilución $1/2$ de una muestra de vino blanco ($WW^{1/2}$) (A) y una muestra de vino tinto y una dilución $1/40$ de una muestra de vino tinto (B), a diferentes concentraciones de BP.

Ejemplos

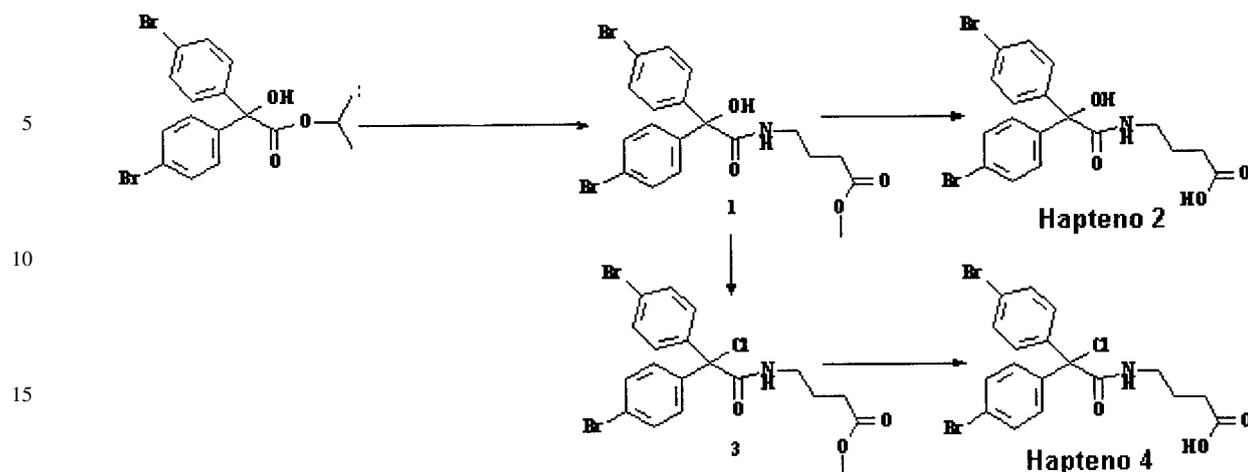
30 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la síntesis de algunos de los haptenos de bromopropilato, la generación de anticuerpos policlonales con ellos y el método inmunoquímico de detección y/o cuantificación de bromopropilato (BP).

35 Ejemplo 1

Síntesis de haptenos de BP

40 1.1. Ácido 2,2-bis(4-bromofenil)-N-2-hidroxiacetamida-butanoico (hapteno 2)

En una solución 1 M de NaOH (5 ml) se añadió una solución de BP (1 g, 2 mmoles, 1eq.) en MeOH (5 ml). La mezcla fue agitada durante 1 h a temperatura ambiente hasta que se apreció la desaparición del producto de partida. El crudo de la reacción fue limpiado con hexano, acidificado con HCl y extraído con AcOEt. La fase orgánica fue secada con MgSO_4 , filtrada y evaporada bajo presión reducida para obtener el ácido bis(4-bromofenil)-2-hidroxiacético (930 mg, 92% rendimiento). ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6); δ : 7.25 (d, J = 8.4 Hz, 4H, Ar *meta*), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 4H, Ar *orto*). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6); δ : 122.3 (q), 129.0 (s), 131.2 (s), 140.6 (q), 172.9 (q). A continuación, se mezcló el ácido (660 mg, 1.72 mmoles, 1eq.) y 1',1'-carbonildiimidazol (CDI) (337 mg, 2.07 mmoles, 1.2 eq.) diluidos en CH_2Cl_2 (10 ml) anhidro. Una solución del clorhidrato de metil 3-aminopropanoato (256 mg, 1.72 mmoles, 1eq.) en CH_2Cl_2 anhidro (2 ml) fue añadido lentamente bajo atmósfera de Ar a la mezcla anterior. Se dejó reaccionar la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente. Se evaporó CH_2Cl_2 y el crudo de reacción fue disuelto en EtO_2 y lavado con NaHCO_3 . La fase orgánica fue secada con MgSO_4 , filtrada y evaporada. Finalmente el crudo de reacción fue purificado para obtener el ester de metil 2,2-bis(4-bromofenil)-N-2-hidroxiacetamida-butanoato (380 mg, 42% rendimiento). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ : 1.85 (q, J = 6.9 Hz J = 6.7 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.32 (t, J = 6.9 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.36 (dt, J = 6.7 J = 6.2 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.64 (s, 1H, $-\text{CH}_3$), 7.28 (d, J = 8.6 Hz, 4H, Ar *meta*), 7.46 (d, J = 8.6 Hz, 4H, Ar *orto*). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3); δ : 24.2 (d), 31.1 (d), 38.9 (d), 51.6 (t), 80.3 (q), 122.3 (q), 129.0 (s), 131.2 (s), 141.4 (q), 172.5 (q), 173.5 (q). Este ester (140 mg, 0.41 mmoles, 1 eq.) fue hidrolizado con una solución acuosa 1 M de NaOH (5 ml) en MeOH (5 ml) a temperatura ambiente hasta la completa desaparición del ester de partida. El crudo de la reacción fue lavado con HCl y extraído con AcOEt. La fase orgánica fue secada con MgSO_4 filtrado y evaporado hasta la sequedad bajo presión reducida par obtener el hapteno 2 (126 mg, 95% de rendimiento). MS, m/z (%) 469.9(100), 467.9(M+, 42), 396.8(10). [Found (by mass spectrometry): M, 467.944060. $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{NO}$ requires M, 467.944605]. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ : 1.77 (q, J = 6.6 Hz J = 6.4 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.28 (t, J = 6.6 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.36 (dt, J = 6.4 J = 6.2 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 7.14 (d, J = 8.6 Hz, 4H, Ar *meta*), 7.38 (d, J = 8.6 Hz, 4H, Ar *orto*). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3); δ : 24.2 (d), 31.3 (d), 39.0 (d), 80.6 (q), 122.4 (q), 129.2 (s), 131.3 (s), 141.2 (q), 172.9 (q), 178.2 (q). IR, ν (KBr, cm^{-1}); 3387 ($-\text{OH}$), 1707 ($\text{C}=\text{O}$), 1655 ($\text{C}=\text{O}$). HRMS: encontrado 467.944060, $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{NO}_4$ 467.944605 (Ruta 1).



Ruta 1. Ruta de síntesis de los haptenos 2 y 4.

1.2. Ácido 4-(2,2-bis(4-bromofenil)-2-cloroacetamido)butanoico (hapteno 4)

Al éster de metil 2,2-bis(4-bromofenil)-N-2-hidroxiacetamida-butanoato (112 mg, 0.23 mmoles, 1 eq.) se le añadió SOCl_2 (165 μL , 2.2 mmoles, 10 eq.) gota a gota y la mezcla fue calentada hasta reflujo durante 1 hora. El crudo de reacción se diluyó en hexano, se lavó con 1M NaOH y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se evaporó con presión reducida para obtener el éster de metil 4-(2,2-bis(4-bromofenil)-2-cloroacetamido)butanoato (59 mg, 50% rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ : 1.81 (q, $J = 5.4$ Hz $J = 5.1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.31 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.78 (s, 1H, $-\text{CH}_3$), 3.84 (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 7.26 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, Ar *orto*). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ : 32.3 (s), 53.2 (d), 60.6 (d), 63.5 (t), 86.1 (q), 122.9 (q), 130.3 (s), 131.4 (s), 139.3 (q), 172.1 (q), 178.2 (q). A continuación este éster (59 mg, 0.11 mmoles, 1 eq.) fue hidrolizado con una solución acuosa 1M de NaOH, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, para obtener finalmente el hapteno 4 (50 mg, 90% rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3); δ : 1.77 (q, $J = 6.6$ Hz $J = 6.4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.3 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.19 (dt, $J = 6.4$ Hz $J = 6.2$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, Ar *orto*). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ : 24.2 (d), 31.3 (d), 39.0 (d), 80.6 (q), 122.4 (q), 129.2 (s), 131.2 (s), 141.2 (q), 172.9 (q), 178.2 (q). IR, ν (KBr, cm^{-1}); 2929 ($-\text{OH}$), 1727 ($\text{C}=\text{O}$), 1658 ($\text{C}=\text{O}$) (Ruta 1).

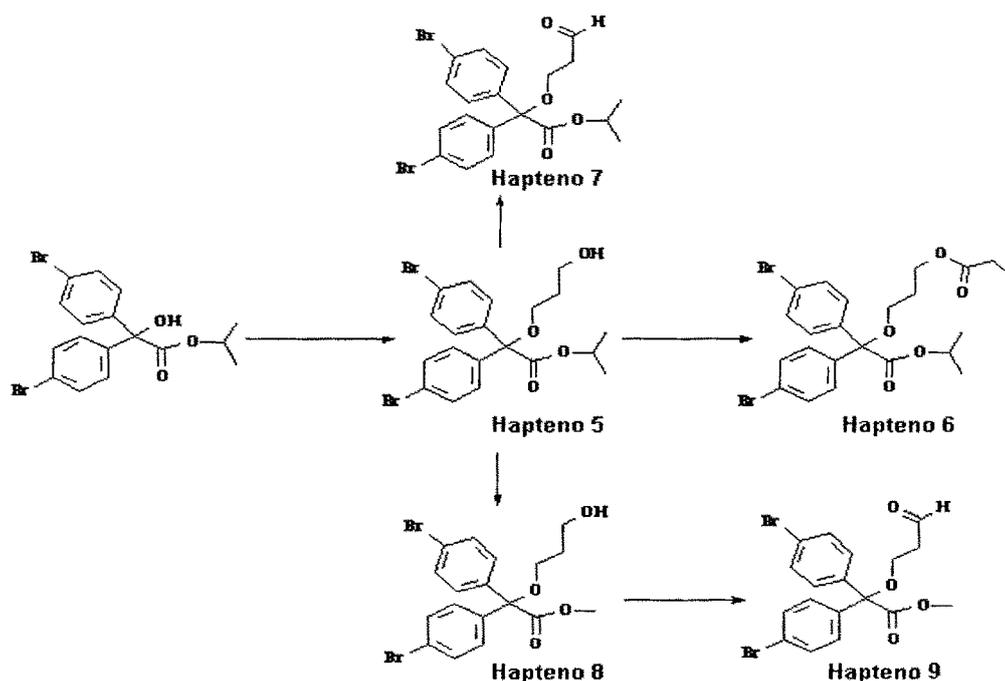
1.3. 2-iodoacetato de propilo 3-((isopropoxicarbonil)bis(4-bromofenil)metoxi)(hapteno 6)

Se añadió SOCl_2 (700 μL , 9.3 mmoles, 4 eq.) gota a gota bajo atmósfera de Ar a BP (1 g, 2.3 mmoles, 1 eq.) y se dejó reaccionar media hora hasta la completa desaparición del producto de partida. El crudo de la reacción fue disuelto en hexano, lavado con NaOH 1M y extraído con AcOEt. La fase orgánica se secó a continuación con MgSO_4 , filtrado y evaporado bajo presión reducida para obtener el éster de isopropil 2,2-bis(4-bromofenil)-2-cloroacetato (0.93 g, 90% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3); δ : 1.24 (d, $J = 5.9$ Hz, 6H, $(-\text{CH}_3)_2$), 5.13 (m, $J = 6.6$, 1H, $-\text{CH}$), 7.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, Ar *orto*). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3); δ : 21.7 (t), 71.9 (s), 75.9 (q), 123.3 (q), 130.4 (s), 131.7 (s), 139.8 (q), 168.3 (q). Este éster (900 mg, 2 mmoles, 1 eq.) fue disuelto en 1,3-propanodiol (2 ml) calentando para facilitar el proceso. A continuación Cs_2CO_3 (167 mg, 0.51 mmoles, 0.2 eq.) fue añadido a la solución y se dejó reaccionar 4 h a 120°C . El crudo fue disuelto en AcOEt, lavado con una solución saturada de NaCl, secado con MgSO_4 , filtrado y evaporado bajo presión reducida, para obtener el éster de isopropil 2-(3-hidroxiopropoxi)-2,2-bis(4-bromofenil)acetato (506 mg, 41% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3); δ : 1.19 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H, $(-\text{CH}_3)_2$), 3.29 (t, $J = 5.5$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.86 (t, $J = 5.5$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.11 (m, $J = 6.2$, 1H, $-\text{CH}$), 7.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, Ar *orto*). A continuación, a una solución de este éster en CH_2Cl_2 (2 ml) fue añadido bajo atmósfera de Ar ácido iodoacético (338 mg, 1.8 mmoles, 3 eq.). La mezcla reaccionó 24 h a 50°C . El crudo de la reacción se diluyó en AcOEt, se lavó con una solución saturada de NaCl, se secó con MgSO_4 , se filtró y se evaporó. A continuación este crudo se purificó mediante cromatografía *flash* usando como fase móvil hexano:AcOEt (4:1) para obtener el hapteno 6 (204 mg, 62% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ : 1.19 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H, $(-\text{CH}_3)_2$), 1.93 (tt, $J = 6.4$ Hz $J = 5.9$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.33 (t, $J = 5.9$, $-\text{CH}_2-$), 3.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 4.27 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.08 (m, $J = 6.3$ Hz, 1H, $-\text{CH}$), 7.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.48 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, Ar *orto*). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3); δ : -5.11(d), 21.8 (t), 29.17 (d), 61.8 (d), 63.6 (d), 70.0 (s), 85.9(q), 123.0 (q), 130.4 (s), 131.3 (s), 140.0 (q), 168.9 (q), 170.3 (q). IR, ν (KBr, cm^{-1}); 1705 ($\text{C}=\text{O}$), 1656 ($\text{C}=\text{O}$). HRMS: encontrado 650.884798, $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{Br}_2\text{IO}_5$, 650.887798 (Ruta 2).

ES 2 341 523 A1

1.4. Acetato de isopropil 2-(2-formiletoxi)-2,2-bis(4-bromofenil) (hapteno 7)

A una solución de clorocromato de piridinio (PCC) (4.14 mg, 1.9 mmoles, 2 eq.) en CH_2Cl_2 anhidro (4 ml) se le añadió el ester de isopropil 2-(3-hidroxiopropoxi)-2,2-bis(4-bromofenil)acetato (467 mg, 0.96 mmoles, 1 eq.) bajo atmósfera de Ar. La mezcla reaccionó 2 h a temperatura ambiente, a continuación se diluyó en AcOEt, se filtró a través de zeolita y se concentró hasta la sequedad. El crudo se purificó mediante cromatografía *flash* usando hexano:AcOEt (4:1) como fase móvil para obtener el hapteno 7 (278 mg, 60% rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3); δ : 1.19 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H, $(-\text{CH}_3)_2$), 2.66 (td, $J = 6.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.33 (t, $J = 6.1$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 5.09 (m, $J = 6.4$ Hz, 1H, $-\text{CH}-$), 5.08 (m, $J = 6.3$ Hz, 1H, $-\text{CH}-$), 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.46 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, Ar *orto*), 9.8 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3); δ : 21.8 (t), 44.1 (d), 60.0 (d), 63.6 (d), 70.0 (s), 86.1 (q), 122.8 (q), 130.3 (s), 131.4 (s), 139.6 (q), 170.1 (q), 201.6 (q). IR, ν (KBr, cm^{-1}); 1727 (C=O), 1587 (C=O). HRMS: encontrado 498.9586, $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{O}_5$ 498.9580 (Ruta 2).



Ruta 2. Ruta de síntesis de los haptenos 6, 7 y 9.

1.5. Acetato de metil 2-(2-formiletoxi)-2,2-bis(4-bromofenil) (hapteno 9)

Una solución de acetato de isopropil 2-(3-hidroxiopropoxi)-2,2-bis(4-bromofenil) (500 mg, 1.03 mmoles, 1 eq.) en MeOH (2 ml) fue hidrolizada con 1M de NaOH (2 ml) siguiendo el protocolo descrito con anterioridad para obtener el ácido de 2-(3-hidroxiopropoxi)-2,2-bis(4-bromofenil)acético (324 mg, 71% rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3); δ : 1.70 (tt, $J = 5.5$ Hz, $J = 5.3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.24 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.91 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H, Ar *orto*). A una solución de este ácido (100 mg, 0.96 mmoles) en MeOH anhidro (2 ml) se le añadió gota a gota SOCl_2 (200 μL , 2.6 mmoles, 4 eq.) bajo atmósfera de Ar. La mezcla fue llevada a reflujo durante 30 min., a continuación fue diluida con hexano, lavada con NaOH 1M y extraída con AcOEt. La fase orgánica fue secada con MgSO_4 , filtrada y evaporada. El crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía *flash* usando hexano:AcOEt (4:1) como fase móvil para obtener acetato de metil 2-(3-hidroxiopropoxi)-2,2-bis(4-bromofenil) (105 mg, 32% rendimiento). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3); δ : 1.81 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$), 3.31 (t, $J = 5.4$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.78 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.26 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, Ar *orto*). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3); δ : 32.3 (t), 53.6 (d), 60.6 (d), 63.5 (d), 86.1 (q), 122.9 (q), 130.3 (s), 131.4 (s), 139.3 (q), 172.1 (q). El mismo protocolo descrito previamente para la preparación del hapteno 7 fue aplicado en la preparación del hapteno 9 (96 mg, >95% rendimiento) obtenido a partir del acetato de metil 2-(3-hidroxiopropoxi)-2,2-bis(4-bromofenil) (105 mg, 0.22 mmoles, 1 eq.) y de PCC (97 mg, 0.45 mmoles, 2 eq.). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3); δ : 2.66 (td, $J = 5.9$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.61 (t, $J = 5.9$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.77 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, Ar *meta*), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H, Ar *orto*), 9.8 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3); δ : 43.6 (t), 52.3 (d), 60.0 (d), 63.6 (d), 85.7 (q), 122.4 (q), 129.7 (s), 131.0 (s), 138.9 (q), 170.8 (q), 201.0 (q). IR, ν (KBr, cm^{-1}); 1757 (C=O), 1580 (C=O). HRMS: encontrado 470.9247, $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{O}_5$ 470.9267 (Ruta 2).

Ejemplo 2

Preparación de los conjugados 2-HCH y 6-HCH y otros inmunoreactivos

5 Los conjugados se purificaron por diálisis contra PBS 10 mM (5 litros, 4 veces) y contra agua miliQ (5 litros, 1 vez). Finalmente se liofilizaron y se almacenaron, secos a -40°C. Se prepararon alícuotas de trabajo disueltas en PBS 10 mM (1 mg/ml, 50 µl) que se almacenaron a 4°C. *Método del anhídrido mixto (MA)*.^{2m} Siguiendo protocolos ya establecidos, el hapteno 2 (15 µmoles) se le hizo reaccionar con tributilamina (4 µL, 16.5 µmoles) e isobutilcloroformiato (3 µl, 18 µmoles) en dimetilformamida (DMF; 160 µl) anhidra. El hapteno activado fue dividido en dos fracciones equivalentes, que fueron añadidas gota a gota sobre una solución de HCH y una solución de BSA (30 mg/cada una) en tampón borato 0.2 M (1.8 ml). *Método del ester activo (AE)*. Siguiendo protocolos ya establecidos, los haptenos 2 y 4 (60 µmoles/cada uno) fueron activados con una solución recién preparada de N-hidroxisuccinimida (NHS, 8.62 mg, 75 µmoles) y diciclohexilcarbodiimida (DCC, 30.9 mg, 150 µmoles) en DMF anhidro (200 µl) durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se les hizo reaccionar con las proteínas BSA; CONA, OVA (10 mg/cada una) y la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, 2 mg) en tampón borato (1.8 ml). *Método de conjugación mediante un aldehído (AC)*. Siguiendo un método ya descrito, haptenos 7 y 9 (10 µmoles) disueltos en DMF anhidro se mezclaron con BSA, CONA, OVA (10 mg/de cada una) y AD (16.4 mg, 5 µmoles de grupos amino) en una solución tamponada de borato (800 µl). A continuación se añadió NaCNBH₃ (100 µmoles) disuelto en 10 mM de solución tamponada de PBS (100 µl). Los reactivos se dejaron reaccionar toda la noche a 4 SC, después de este tiempo se añadió 100 µmoles extra de NaCNBH₃ y se dejó que reaccionara 30 min. más a temperatura ambiente. Las soluciones de las macromoléculas conjugadas (AD y BSA) fueron centrifugadas y el precipitado descartado. Los rendimientos fueron del 20% y del 55% para AD y BSA respectivamente. *Método de conjugación mediante halógenos (HC)*. Siguiendo un protocolo ya descrito, el hapteno 6 (10 µmoles) se disolvió en DMF (100 µl) y se añadió gota a gota a unas soluciones tamponadas de borato (1.8 ml) con BSA y HCH disueltas (30 mg/cada una). Las proteínas habían sido tratadas previamente con hidrócloruro de 2-iminotiolano y purificadas mediante columna de exclusión molecular Hi-Trap con Sephadex G-25. la reacción se dejó 24 h a temperatura ambiente. Los conjugados proteicos fueron purificados mediante columna Hi-Trap con Sephadex G-25.

30 Los conjugados se caracterizaron mediante los espectros de Maldi-TOF-MS. Las muestras se prepararon mezclando 2 µl de la solución utilizada como matriz, preparada recientemente, con 2 µl de una solución de los conjugados o proteínas. Para la preparación de la matriz se hizo una solución 10 mg/ml del ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico en CH₃CN/H₂O 70:30 con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Los conjugados se prepararon en solución de 10 mg/ml en el mismo disolvente. El cálculo de la densidad de haptenos se realizó restando el peso molecular (PM) de la proteína conjugada y el PM de la misma proteína sin conjugar, y dividido todo por el PM del hapteno. $PM_{Conj} - PM_{prot} / PM_{Hapteno}$.

TABLA 1

Densidad de hapteno en los conjugados de BSA^a

Metodo de conjugación	Hapteno	δ-Hapteno ^b	
		BSA	CONA
<i>Anhídrido mixto</i>	2	4	--- ^c
<i>Ester activo</i>	2	3	2
	4	24	14
<i>Conjugación por iodo</i>	6	4	--- ^c
<i>Conjugación aldehído</i>	7	11	5
	9	--- ^d	--- ^d

^aLas densidades están calculadas por MALDI-TOF-MS.^bMoles de hapteno por mol de proteína.^cNo se prepararon.^dNo fue posible el análisis por MALDI-TOF-MS.

ES 2 341 523 A1

Ejemplo 3

Obtención del anticuerpo policlonal con los inmunógenos selectivos para BP

5 El protocolo de inmunización fue llevado a cabo con conejos hembra de la variedad Nueva Zelanda, pesando 1 -2 kg. Los conejos 174, 175 y 176 fueron inmunizados con 2-HCH y los conejos 177, 178, y 179 fueron inmunizados con 6-HCH usando 100 μg del correspondiente conjugado de hemocianina (2-HCH y 6-HCH se emplean como inmunógenos). Las inmunizaciones se llevaron a cabo cada mes hasta 6 meses en total hasta que se observó un incremento del título del anticuerpo. Los correspondientes antisueros (As) fueron nombrados según el número del anticuerpo. 10 La evolución del título del As fue controlada mediante un experimento de afinidad con diluciones seriadas del As en microplacas tratadas con el hapteno 2-BSA (AE) para los As 174-176 y con el hapteno 6-BSA (HC) para los As 177-179. Después de observar un título adecuado los animales fueron desangrados y la sangre fue colectada en tubos vacutainers con gel de separación de sueros. Los antisueros fueron obtenidos después de centrifugar y guardados a -40°C con 0.02% de NaN_3 . La fracción de anticuerpos procedente de los antisueros anteriores fue purificada utilizando 15 los métodos de precipitación con sulfato amónico y posterior purificación por afinidad contra proteína A o G.

Ejemplo 4

Método inmunoquímico específico para la detección y/o cuantificación de BP y compuestos de su familia química

20 Mediante el método inmunoquímico de la presente invención sin optimizar se midió la respuesta competitiva entre el BP y los conjugados competidores respecto a los antisueros obtenidos con los haptenos 2 y 6 conjugados ambos con la proteína HCH. Los mejores resultados se recogen en la tabla 2.

25 Las microplacas se tapizaron con los antígenos diluidos adecuadamente (100 μl /pozo en tampón de tapizado) una noche entera a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las placas 4 veces con PBST y se añadió el As diluido apropiadamente (100 μl /pozo con tampón PBST). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo tal y como se había hecho anteriormente. Una solución de antiIgG-HRP (anticuerpos contra inmunoglobinas G de conejo, desarrollados en cabras) se adicionó a los pocillos (1/6000 en PBST, 100 μl /pozo) y se dejó incubar 30 minutos más a 30 temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4 veces y se añadió la solución de sustrato (100 μl /pozo). Después de 30 minutos a temperatura ambiente y al resguardo de la luz, se paró la reacción enzimática con H_2SO_4 4N (50 μl /pozo) y se leyeron las absorbancias.

TABLA 2

35 *Parámetros de ajuste de la respuesta de los mejores ensayos competitivos obtenidos con los antisueros resultantes de la inmunización con 2-HCH (AS 174 a 176) y 6-HCH (As 177 a 179)^a*

Immunógeno	Antígeno/As	A_{max}	A_{min}	$^b\text{IC}_{50}$	Pendiente	R^2
2-HCH	9-BSA/As174	1.20	0.28	0.68	-0,52	0.98
	7-BSA/As174	1.30	0.31	5.3	-0.55	0.99
	4-BSA/As 174	0.72	0.07	0.67	-0.9	0.90
	2-BSA/As176	0.99	0.01	17.3	-0.62	0.99
	2-CONA/As176	1.35	0.02	51.1	-0.72	0.99
	2-OVA/As176	1.53	0.01	33.6	-0.54	0.99
	4-BSA/As176	1.19	0.06	24.0	-0.87	0.99
6-HCH	4-BSA/As178	1.34	0.03	165.3	-0.73	0.99
	4-OVA/As178	0.97	0.05	89.7	-0.57	0.99

65 ^a Solo se indican los ensayos que mostraron buenas características y con IC_{50} menores de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. ^b IC_{50} esta expresado en $\mu\text{g L}^{-1}$.

ES 2 341 523 A1

Las combinaciones anteriores se sometieron a un proceso de optimización para determinar las mejores condiciones para realizar el ensayo y que son las recogidas en el procedimiento indicado. Las características del ensayo final se recogen en la tabla 3. Las microplacas de pocillos fueron tratadas con el conjugado 9-BSA ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en tampón de tapizado, $100 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) durante una noche a 4°C y cubiertas durante proceso con adhesivos protectores. Al día siguiente, las placas fueron lavadas con PBST (cuatro veces, $300 \mu\text{l}/\text{pocillo}$). Las curvas de calibrado fueron preparadas mediante soluciones seriadas en DMSO ($1075 \cdot 10^3 \text{ nM} - 34 \text{ nM}$), diluidas 200 veces ($5375 \text{ nM} - 0.17 \text{ nM}$) en PBS 10 mM y añadidas a las microplacas ($50 \mu\text{l}/\text{pocillo}$), seguido del As 174 ($1/1000$ en PBS 10 mM , $50 \mu\text{l}/\text{pocillo}$). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas de nuevo como se describe anteriormente y una solución de antiIgG-HRP ($1/6000$ en PBST) fue añadida ($100 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) e incubada de nuevo 30 minutos más a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas de nuevo, y se añadió la solución con el sustrato ($100 \mu\text{l}/\text{pocillo}$). El desarrollo de color fue parado después de 30 min. a temperatura ambiente y a resguardo de la luz con $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 4N}$ ($50 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) y se leyeron las absorbancias a 450 nm . Los datos se ajustaron a una ecuación de cuatro parámetros, $Y = [(A-B)/1 - (x/C)^D] + B$.

TABLA 3

Parámetros de los inmunoensayos optimizados 9-BSA/As174 y 9-AD/As174^a

	9-BSA/As174^b	9-AD/As174^b
A_{min}	0.21 ± 0.05	0.10 ± 0.03
A_{max}	1.23 ± 0.10	1.61 ± 0.03
Slope	-1.51 ± 0.27	-1.51 ± 0.18
IC₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.22 ± 0.14	1.52 ± 0.19
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.14 ± 0.08	0.21 ± 0.04
Margen de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.40 ± 0.16 to 4.92 ± 1.20	0.49 ± 0.03 to 3.64 ± 0.19
R²	0.99	0.99

^aLos parámetros se derivan del ajuste de la respuesta a una ecuación logística de cuatro parámetros. ^bLos datos son el promedio de 8 curvas de calibración realizadas en 5 días diferentes.

Ejemplo 5

Determinación de la reactividad cruzada

Soluciones patrón de diferentes pesticidas, herbicidas y fungicidas fueron preparadas en DMSO a una concentración de 1 mM . Las curvas de calibrado fueron preparadas para cada analito en PBST ($5375 \text{ nM} - 0.17 \text{ nM}$) y medidos mediante el inmunoensayo. De las ecuaciones de ajuste se pudo obtener el valor de la IC_{50} para cada uno de los analitos. El porcentaje de reactividad cruzada se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula, $(\text{IC}_{50\text{BP}}/\text{IC}_{50\text{compuesto}}) \times 100$.

ES 2 341 523 A1

TABLA 4

Interferencia de otros pesticidas en la determinación de bromopropilato mediante el inmunoensayo que utilice el conjugado 9-BSA y el antisuero 174, expresada como porcentaje de reactividad cruzada^a

5

10

15

20

25

30

35

40

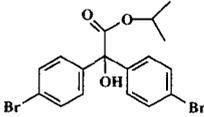
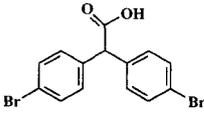
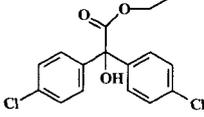
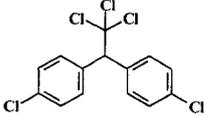
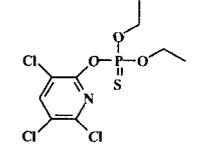
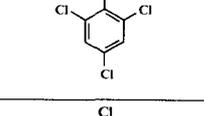
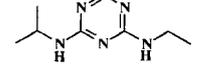
45

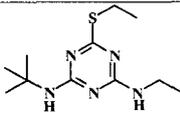
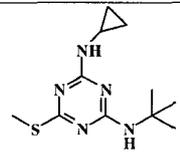
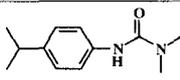
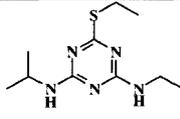
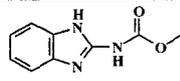
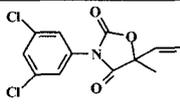
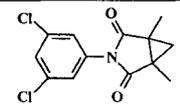
50

55

60

65

Grupo	Compuesto	Fórmula	IC50 ^b	% CR.
Miticidas, Insecticidas	Bromopropilato		3.46	100
	Ácido 4,4'- bromobenzílico		5.16	67
	Clorobenzilato		5.43	64
	DDT		>1000	0
	Clorpirifos		>1000	0
	2,4,6-TCP		>1000	0
Herbicidas	Atrazina		>1000	0

5	Terbutrin		>1000	0	
10	Irgarol 1051		>1000	0	
15	Isoproturon		>1000	0	
20	Ametrin		>1000	0	
25	Carbendazim		>1000	0	
30	Fungicidas	Vinclozolin		300	1
35		Procimidiona		249	1

^aLa reactividad cruzada se expresa como el % del IC₅₀ para el compuesto considerado respecto al IC₅₀ para el bromopropilato. ^b IC₅₀ esta dado en concentración nM

Exactitud. Con el ELISA desarrollado se ensayaron diversas muestras fortificadas, para conocer el grado de exactitud de los inmunoensayos. Se procesaron las placas siguiendo, en cada formato, el protocolo general descrito anteriormente. En total se midieron 9 muestras fortificadas con el analito que se midieron por triplicado (Fig. 4).

Ejemplo 6

Método para la detección de BP (y compuestos de su familia química) en muestras de vino

Muestras de vino blanco y vino tinto (disponibles comercialmente) fueron utilizadas para el estudio del ensayo optimizado. Las muestras fueron tamponadas ajustándose el pH a 7.5 y utilizándose para preparar las curvas estándar de BP. El ensayo fue llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito con anterioridad y las absorbancias obtenidas fueron ajustadas a la ecuación de 4 parámetros para comparar los resultados con la curva en ausencia de vino.

Disoluciones de PBS con diferentes proporciones de EtOH (v/v) (0, 1, 2, 5, 10 y 20%) fueron usadas para preparar las curvas de calibrado estándar (Fig. 5), y se realizó un ensayo ELISA siguiendo el protocolo para el ensayo optimizado del hapteno 9-BSA/As 174 descrito anteriormente. El resto de la interferencia de la matriz se eliminó diluyendo la muestra 40 veces (Fig. 6). En estas condiciones la sensibilidad queda reducida pero el límite de detección resultante para el BP queda en 5.6 ppb lo cual aún es suficiente según los límites admitidos.

REIVINDICACIONES

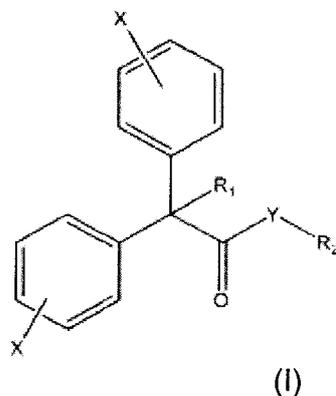
1. Hapteno de bromopropilato (BP) de fórmula general I

5

10

15

20



25 Donde

X es un halógeno seleccionado de entre Cl, Br, I ó F;

R₁ se selecciona de entre Cl, Br, OH ó O-(CH₂)_n-Rg; donde n toma valores de entre 2 a 4 y Rg se selecciona de entre OH, CHO, COOH, NH₂ SH o OCOCH₂I,

30

Y es O ó NH y

cuando Y es O, R₂ es H o alquilo (C₁-C₄) y

35

cuando Y es NH, R₂ es -(CH₂)_n-Rg; donde n toma valores de entre 2 a 4 y Rg se selecciona de entre OH, CHO, COOH, NH₂ o SH.

2. Hapteno de BP según la reivindicación 1 donde X es Br.

40

3. Hapteno de BP según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde Y es O y R₂ es un grupo metil o isopropilo.

4. Hapteno de Bromopropilato (BP) según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde Y es NH y R₂ es -(CH₂)₃-COOH.

45

5. Hapteno de BP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se selecciona de la lista que comprende:

- ácido 2,2-bis(4-bromofenil)-N-2-hidroxiacetamida-butanoico,
- ácido 4-(2,2-bis(4-bromofenil)-2-cloroacetamido)butanoico,
- 2-iodoacetato de propilo 3-((isopropoxycarbonil)bis(4-bromofenil)metoxi),
- acetato de isopropil 2-(2formiletoxi)-2,2-bis(4-bromofenil), o
- acetato de metil 2-(2-formiletoxi)-2,2-bis(4-bromofenil).

55

6. Hapteno de BP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 conjugado con una proteína o un polímero.

60

7. Hapteno de BP según la reivindicación 6 donde la proteína se selecciona de la lista que comprende hemocianina de lapa (HCH), seroalbúmina bovina (BSA), ovalbúmina (OVA) o conalbúmina (CONA).

8. Uso del hapteno de BP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la síntesis de inmunoreactivos.

65

9. Uso del hapteno de BP según la reivindicación 8 donde el inmunoreactivo se selecciona de la lista que comprende antisuero, anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, antígeno, trazador para inmunoensayos o trazador para inmunosensores.

ES 2 341 523 A1

10. Método para la detección y/o cuantificación en una muestra de BP o de un analito derivado de BP que comprende:

- a. Inmovilizar un hapteno según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 (antígeno) en un soporte sólido
- b. mezclar la muestra y un anticuerpo o antisuero anti-antígeno en el soporte sólido del apartado (a) para formar un primer complejo,
- c. añadir un segundo anticuerpo marcado al complejo formado según el apartado (b) para formar un segundo complejo y
- d. detectar y/o cuantificar el segundo complejo obtenido según el apartado (c) con una composición que contenga un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente.

11. Método según la reivindicación 10 que comprende:

- a. Inmovilizar un hapteno según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 (antígeno) en un soporte sólido,
- b. añadir la muestra y anticuerpos Ac1 preincubados, al antígeno inmovilizado del apartado (a) e incubar,
- c. añadir anticuerpos anti-Ac1 (Ac2) conjugados con una enzima, a los anticuerpos Ac1 del apartado (b) e incubar,
- d. lavar después de cada uno de los pasos (a), (b) y (c),
- e. añadir un sustrato de la enzima al producto obtenido en el apartado (c) e incubar,
- f. medir la absorbancia del producto obtenido en el apartado (e) y
- g. comparar la absorbancia medida en el apartado (f) con la absorbancia del control y determinar la concentración del analito de la muestra.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 donde la muestra es vino.

13. Kit para la detección y/o cuantificación en una muestra de BP o de un analito derivado de BP que comprende, anticuerpos Ac1 y, al menos, un hapteno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

14. Kit según la reivindicación 13 que además comprende anticuerpos Ac2.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 341 523

② Nº de solicitud: 200803612

③ Fecha de presentación de la solicitud: **18.12.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 3700720 A (YAIR SPRINZAK) 24.10.1972, todo el documento, en especial compuestos con RN 27768-71-4, RN 23197-77-5, RN 23197-76-4, RN 23197-75-3, RN 23197-74-2.	1,2,3
X	FR 2133813 A (BAYER. AG.) 01.12.1972, página 10, ejemplo 3, compuesto con RN 39144-61-1.	1,2,3
X	Base de datos Registry [recuperado el 25.03.2010]. STN International, Columbus, Ohio (EEUU). Compuesto con RN 53566-18-0, fecha de entrada en Registry 16.11.1984.	1,2
A	MARTEL, A-C y ZEGGANE, S. Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. Journal of Chromatography. 2002, Vol. 954, Nº 1- 2, páginas 173-180, ISSN 0021-9673. Todo el documento.	1-14
A	LIAPIS, K.S. y col. Rapid multi-residue method for the determination of azinphos methyl, bromopropylate, chlorpyrifos, dimethoate, parathion methyl and phosalone in apricots and peaches by using negative chemical ionization ion trap technology. Journal of Chromatography. 2003, Vol. 996, Nº 1-2, páginas 181-187, ISSN 0021-9673. Todo el documento.	1-14
A	LEE, N. y col. Haptens synthesis and development of ELISAs for detection of Endosulfan in water and soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1995, Vol. 43, Nº 6, páginas 1730-1739. Todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.03.2010

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 57/58 (2006.01)

C07C 233/51 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

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

C07C, G01N

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

INVENES, EPODOC, REGISTRY, BEISLSTEIN, HCAPLUS, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-14	SÍ
	Reivindicaciones 1-3	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-14	SÍ
	Reivindicaciones 1-3	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 3700720 A	24-10-1972
D02	FR 2133813 A	01-12-1972
D03	Base de datos Registry.	16-11-1985
D04	Journal of Chromatography, Vol. 954, N° 1-2	2002
D05	Journal of Chromatography, Vol. 996, N° 1-2	2003
D06	Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 43, N° 6	1995

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

La invención se refiere a haptenos derivados de bromopropilato (BR) de fórmula general I, sus usos para la síntesis de inmunoreactivos así como un método inmunoquímico para la detección y cuantificación de bromopropilato con un umbral de 0.14 microgramos por litro y sus respectivos Kits. Estos haptenos empleados tanto para la inmovilización en el soporte sólido como para la inmunización de animales para obtener los respectivos anticuerpos policlonales, presentan un alto reconocimiento de pesticidas que contienen un grupo bis-halofenilmetileno en su estructura. Además el bromopropilato se puede analizar directamente en muestras de vino.

El documento D01 recoge derivados de bis (4-bromofenil)-alfa-hidroxi- acetado de sec-butilo, isobutilo, n-butilo, etilo, metilo.

El documento D02 se refiere entre otros al compuesto acaricida ester metílico del alfa-bromo-alfa-bis-(p-bromofenil) acetato.

La referencia que constituye el documento D03 recoge el compuesto bis (4-bromofenil)-alfa-hidroxi- acetamida de 2 -hidroxi-etilo.

Estos compuestos divulgados en los documentos D01 a D03 del estado de la técnica aparecen recogidos en la definición de la fórmula general I definida en las reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud.

Por tanto, se considera que el objeto de la reivindicaciones 1 a 3 de la solicitud carece de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Los documentos D04 y D05 se refieren a métodos de detección de bromopropilato mediante técnicas cromatográficas como cromatografía líquida de alto rendimiento (D04) y cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (D05).

El documento D06 tiene por objeto la detección de pesticidas como Endosulgan (insecticida orgánico) y otros agentes contaminantes ambientales, mediante inmunoensayos.

No se ha encontrado divulgado, ni sugerido en el estado de la técnica compuestos como los recogidos en las reivindicaciones 4 a 7 de la solicitud, ni su uso en la síntesis de inmunoreactivos, ni el método de detección y/o cuantificación de bromopropilato especificados en la presente solicitud.

En consecuencia se considera que las reivindicaciones 4 a 14 de la solicitud tienen novedad e implican actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1LP 11/1986).