

La anatoxina-a es una potente neurotoxina producida por cianobacterias de agua dulce. Bajo ciertas condiciones ambientales, estos microorganismos son capaces de proliferar de forma masiva, dando lugar a floraciones o *blooms*, liberando concentraciones importantes de anatoxina-a. La presencia de esta biotoxina en ecosistemas de agua dulce ha causado episodios de intoxicación en humanos, así como un elevado número de incidentes mortales en ganado, animales domésticos y fauna salvaje.

La posibilidad de detectar la presencia de bajas concentraciones de anatoxina-a en fuentes de abastecimiento de agua, en aguas de uso recreativo o incluso en alimentos, constituye una eficaz aproximación para reducir el riesgo de exposición a esta biotoxina. En este sentido, y ante la ausencia de métodos rápidos y sencillos para la determinación de anatoxina-a, la presente Tesis Doctoral está enfocada a la obtención de anticuerpos monoclonales de alta afinidad y especificidad que posibiliten el desarrollo de métodos inmunoanalíticos para esta cianotoxina.

En esta memoria se describen varias estrategias químicas para sintetizar derivados funcionalizados (haptenos) de anatoxina-a. Así mismo, se detalla la preparación de los correspondientes bioconjugados de inmunización y ensayo, y se discuten los resultados obtenidos en la identificación y selección de hibridomas productores de anticuerpos frente a anatoxina-a.

Este trabajo se desarrolló de manera conjunta en el Dpto. de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y en el Dpto. de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la dirección del Profesor Antonio Abad Somovilla y del Dr. Antonio Abad Fuentes.

Tesis  
Doctoral

Síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a  
para el desarrollo de métodos inmunoquímicos

Guillermo  
Quiñones  
Reyes

2016



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA  
Facultad de Química  
Dpto. de Química Orgánica

 **CSIC**  
Instituto de Agroquímica y  
Tecnología de Alimentos

# Síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a para el desarrollo de métodos inmunoquímicos

TESIS DOCTORAL  
Guillermo Quiñones Reyes

Directores:  
Dr. Antonio Abad Somovilla  
Dr. Antonio Abad Fuentes

Valencia, 2016



 **CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA  
Facultad de Química  
Dpto. de Química Orgánica



Programa de Doctorado en Química del R.D. 99/2011

## Síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a para el desarrollo de métodos inmunoquímicos

Trabajo realizado por el licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo **Guillermo Quiñones Reyes** en el Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València bajo la dirección del Profesor Dr. Antonio Abad Somovilla y en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC) bajo la dirección del Dr. Antonio Abad Fuentes para optar al grado de Doctor en Química.

Valencia, Enero 2016

Fdo. Guillermo Quiñones Reyes



---

Dr. D. Antonio Abad Somovilla, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y

Dr. D. Antonio Abad Fuentes, Científico Titular del Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

## CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a para el desarrollo de métodos inmunoquímicos**”, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica (Universidad de Valencia) y en el Departamento de Biotecnología (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos), por el licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo Guillermo Quiñones Reyes y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Valencia, Enero 2016

Fdo. Dr. Antonio Abad Somovilla

Fdo. Dr. Antonio Abad Fuente



---

## *Agradecimientos*

En estas breves líneas quiero expresar mi profunda gratitud al Dr. Antonio Abad Somovilla y al Dr. Antonio Abad Fuentes por la oportunidad brindada al permitirme ingresar en su grupo de investigación. Agradezco sus enseñanzas, consejos, paciencia y palabras de aliento en los momentos difíciles, cuando nada parecía funcionar, por hacer lo complicado sencillo y por esas lecciones – aún sin proponérselo o percatarse de ello – de calidez humana.

A la Dra. Consuelo Agulló, Dr. Josep Vicent Mercader y al Dr. Francesc Esteve por sus consejos y experiencia compartida, por conducirme literalmente de la mano en el trabajo de laboratorio, les estoy muy agradecido.

A la Dra. Isabel Fernández por su apoyo y todas las facilidades prestadas que hicieron posible mi estancia por estos pasillos. Gracias.

De manera especial hago extensivo mi agradecimiento a la Dra. Victoria Concha y Dr. José Carranza por darme la oportunidad, su apoyo incondicional y estar siempre a mi lado.

A mi esposa Berenice y mis hijos. Gracias por estar siempre a mi lado y ser fuente de todo propósito. A mi madre y hermanos.

A mis compañeros de laboratorio que siempre están ahí para dar esa chispa de sabiduría, alegría, majadería y vida a las largas jornadas de trabajo. A Javi, Eric, Dani, Hayden, Luis, Marc, Maikel, Mr. Lode, Fares, Víctor, Nuria, y por supuesto al estimado Dr. Carlos Vila que es quién dispensa orden y conocimiento. Gracias a todos ustedes por su amistad y apoyo brindado desde mi primer día en el departamento. No quiero dejar fuera a Andrea, Marcos, Alicia, Meli y Amparo, que aunque ya no están por el departamento, su amistad y compañerismo continúa.

A la Subsecretaría de Educación Pública y a la Universidad Autónoma de Zacatecas en México por la Beca PROMEP otorgada y,

A la Universidad de Valencia a través de la Facultad de Química y el Departamento de Química Orgánica, así como al Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA).



---

A la memoria de mi Padre



---

**ÍNDICE**

	<b>Página</b>
Glosario de abreviaturas y acrónimos	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1.1 Anatoxina-a	11
1.2 Características estructurales de anatoxina-a	14
1.3 Estabilidad de anatoxina-a	15
1.4 Métodos de análisis de anatoxina-a	17
1.4.1 Métodos cromatográficos	17
1.4.2 Métodos de reconocimiento molecular	19
1.4.2.1 Inmunoensayos tipo ELISA	20
1.5 Obtención de anticuerpos hacia anatoxina-a	21
1.5.1 Síntesis de haptenos, la etapa determinante	22
1.5.1.1 Estrategias de síntesis para anatoxina-a y análogos estructurales	24
1.5.1.1.1 Apertura de $\beta$ -lactamas	25
1.5.1.1.2 Expansión de anillos de tropano	26
1.5.1.1.3 Cicloadiciones de nitronas	27
1.5.1.1.4 Preparación de análogos estructurales de anatoxina-a	28
1.5.2 Preparación de conjugados proteicos	34
1.5.3 Producción de anticuerpos	36
1.5.3.1 Inmunización y tipos de anticuerpos	38
1.5.3.2 Tecnología de generación de hibridomas	39
1.5.4 Caracterización de anticuerpos	43
1.5.4.1 Formatos de ELISA competitivo	44
1.5.4.1.1 Formato Indirecto o de conjugado inmovilizado	45
1.5.4.1.2 Formato directo o de anticuerpo inmovilizado	46
1.5.4.2 Optimización de la sensibilidad del ensayo	48
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
3.1 Diseño de los haptenos	53
3.2 Síntesis de haptenos de anatoxina-a y preparación de bioconjugados	59
3.2.1 Preparación del hapteno ANs: acceso directo a bioconjugados proteicos	59
3.2.2 Síntesis de los haptenos AN $n$ , AN $m$ y AN $c$	62
3.2.2.1 Obtención del esqueleto azabíclico común a anatoxina-a y a los haptenos	62
3.2.2.2 Síntesis del hapteno AN $n$	66
3.2.2.3 Síntesis del hapteno AN $m$	80
3.2.2.4 Síntesis del hapteno AN $c$	84
3.2.3 Preparación de bioconjugados de los haptenos AN $n$ , AN $m$ y AN $c$	86

---

3.2.3.1	Activación de los haptenos: formación de los ésteres de <i>N</i> -hidroxisuccinimidilo	86
3.2.3.2	Preparación de los bioconjugados proteicos	95
3.3	Preparación de anatoxina-a racémica y separación de los enantiómeros (+)- y (-)-anatoxina-a	98
3.4	Síntesis del hapteno de un derivado de anatoxina-a y preparación de bioconjugados	102
3.4.1	Síntesis y activación del hapteno <i>ANd</i>	103
3.4.2	Preparación del nuevo hapteno derivado de anatoxina-a. Síntesis del hapteno <i>ANdm</i>	107
3.4.3	Preparación de los bioconjugados del hapteno <i>ANdm</i>	109
3.5	Inmunización y producción de anticuerpos	109
3.5.1	Generación de hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales	110
3.6	Caracterización de anticuerpos	114
3.6.1	Anticuerpos monoclonales frente a anatoxina-a	114
3.6.1.1	Formato indirecto o de conjugado inmovilizado	114
3.6.1.2	Formato directo o de anticuerpo inmovilizado	117
3.6.2	Anticuerpos monoclonales frente a anatoxina-a derivatizada	119
3.6.2.1	Formato indirecto o de conjugado inmovilizado	119
3.6.2.2	Formato directo o de anticuerpo inmovilizado	121
<b>4.</b>	<b>RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	125
<b>5.</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	135
5.1	Reactivos, aparatos y técnicas generales	135
5.1.1	Síntesis de haptenos y anatoxina-a	135
5.1.2	Análisis de muestras por UHPLC-MS	136
5.1.3	Preparación de conjugados proteicos	137
5.1.3.1	Análisis de conjugados proteicos por MALDI-TOF-MS	137
5.1.4	Cultivos celulares y producción de anticuerpos	138
5.1.5	Análisis mediante ELISA	138
5.2	Síntesis de haptenos	140
5.2.1	Síntesis de los haptenos <i>ANn</i> , <i>ANm</i> y <i>ANc</i>	140
5.2.1.1	Obtención del esqueleto azabíclico de anatoxina-a y los haptenos	140
5.2.1.2	Síntesis del hapteno <i>ANn</i>	142
5.2.1.3	Síntesis del hapteno <i>ANm</i>	152
5.2.1.3.1	Síntesis del clorhidrato del hapteno <i>ANm</i>	152
5.2.1.3.2	Síntesis del trifluoroacetato del NHS éster del hapteno <i>ANm</i>	156
5.2.1.4	Síntesis del hapteno <i>ANc</i>	160
5.3	Obtención de los enantiómeros (+)- y (-)-anatoxina-a	163
5.3.1	Separación de los enantiómeros de <i>N</i> -Boc anatoxina-a	163
5.3.2	Formación de los clorhidratos de (+)- y (-)-anatoxina-a	164
5.4	Síntesis del hapteno de anatoxina-a derivatizada	164

---

---

5.4.1	Ensayos preliminares de reactividad de anatoxina-a con el reactivo de Sanger	164
5.4.2	Síntesis del hapteno AN <i>d</i>	166
5.4.3	Síntesis del hapteno AN <i>dm</i>	171
5.5	Síntesis de los derivados de anatoxina-a patrones	176
5.5.1	Síntesis de anatoxina-a derivatizada con reactivo de Sanger (1-Flúor-2,4-dinitrobenceno) (AN-DNB)	176
5.5.2	Obtención de los enantiómeros del derivado de anatoxina-a AN-DM	177
5.5.2.1	Síntesis de AN-DM racémico	177
5.5.2.2	Separación de los enantiómeros de AN-DM	179
5.6	Preparación de bioconjugados proteicos	181
5.6.1	Preparación de los bioconjugados de AN <i>s</i>	181
5.6.2	Preparación de los bioconjugados de AN <i>n</i> , AN <i>m</i> y AN <i>c</i>	182
5.6.2.1	Preparación de los conjugados inmunogénicos con BSA	183
5.6.2.2	Preparación de los conjugados de ensayo	183
5.6.2.2.1	Preparación de los conjugados de tapizado con OVA	183
5.6.2.2.2	Preparación de trazadores enzimáticos con HRP	183
5.7	Producción de anticuerpos monoclonales	184
5.7.1	Inmunización de ratones	184
5.7.2	Obtención de antisueros de ratón	184
5.7.3	Fusiones celulares: generación de hibridomas	184
5.7.4	Selección, clonación y conservación de hibridomas	185
5.7.5	Producción y purificación de anticuerpos monoclonales	187
5.8	Inmunoensayos para la detección de anatoxina-a	187
5.8.1	ELISA competitivo de conjugado inmovilizado (formato indirecto)	187
5.8.2	ELISA competitivo de anticuerpo inmovilizado (formato directo)	188
5.8.3	Procesamiento de la señal y curvas de inhibición	188
6.	<b>REFERENCIAS</b>	191
	<b>ANEXOS</b>	

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Å	Angstrom
Ac	Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
A <sub>max</sub>	Absorbancia máxima
A <sub>min</sub>	Absorbancia mínima
AN	Anatoxina-a
ATR	Reflectancia total atenuada
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
BSA	Seroalbúmina bovina
Cbz	Bencil carbamato
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Correlación homonuclear de <sup>1</sup> H
ELISA	Inmunoensayo enzimático en soporte sólido
DEPT	Incremento sin distorsión por transferencia de polarización
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMP	Periodinano de Dess-Martin
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Carbonato de <i>N,N'</i> -disuccinimidilo
EE. UU.	Estados Unidos de Norteamérica
EFSA	European Food Safety Authority
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i>
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ES	Electrospray
Et	Etilo
EtOH	Etanol
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectrophotometer
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HSQC	Correlación cuántica heteronuclear sencilla
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibición media
IR	Infrarrojo
KHMDS	Hexametildisilazida potásica
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
mAbs	Anticuerpos monoclonales
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo

MeOH	Metanol
Mr	Masa molecular
MW	Microondas
nAChRs	Receptores de acetilcolina de tipo nicotínico
NMO	<i>N</i> -óxido de <i>N</i> -metilmorfolina
OPD	<i>orto</i> -fenilendiamina
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween 20
Ph	Fenilo
Pd/C	Paladio adsorbido sobre carbón activo
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
RM	Relación molar
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
S <sub>N</sub> 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
<i>spp</i>	Especies del mismo género
t.a.	Temperatura ambiente
Tf	Triflato
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilsililo/Tetrametilsilano
TPAP	Perruthenato de tetrafenilamonio
TOF	Espectrometría de masas con tiempo de vuelo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta-Visible/Ultravioleta
W	Watt/vatio



## 1. INTRODUCCIÓN

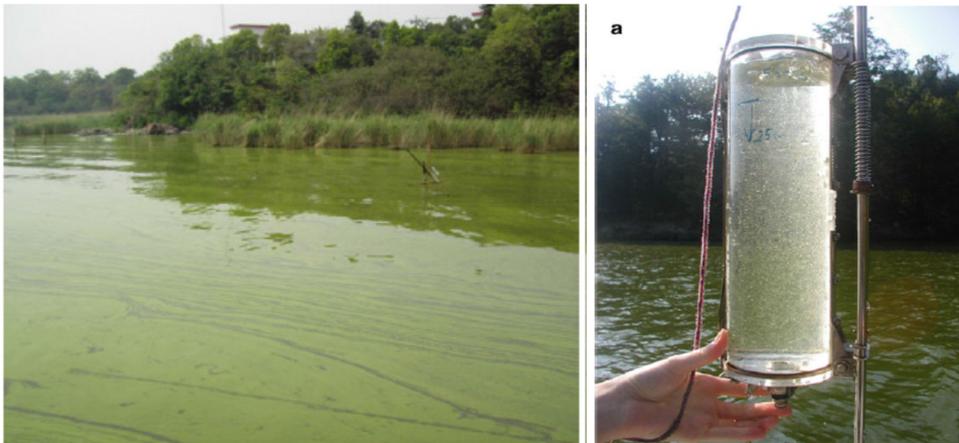
La exposición de los consumidores, y en especial de la población infantil, a sustancias tóxicas a través de la dieta constituye un motivo de inquietud para los ciudadanos (Eurobarómetro 2010).<sup>1</sup> Según los informes anuales publicados por el Sistema de Alertas Rápidas para Alimentos y Piensos (RASFF) de la Comisión Europea, alrededor del 40% de las notificaciones informativas emitidas durante los últimos años fueron debidas a la presencia de algún tipo de sustancia química (plaguicidas, sustancias de uso veterinario, aditivos y colorantes no autorizados, biotoxinas, etc.).<sup>2</sup> Entre las sustancias potencialmente presentes en alimentos, aguas y piensos, las **biotoxinas** representan un serio problema para la salud humana y el bienestar animal, ocasionando importantes pérdidas económicas a los sectores agroalimentario, agropecuario y piscícola, y pudiendo afectar gravemente a la salubridad del agua potable.

Las biotoxinas son agentes químicos no infecciosos de origen biológico que pueden ser producidas por todo tipo de organismos, desde microorganismos como bacterias, hongos y algas, hasta animales y/o plantas superiores. Estas sustancias pueden ser nocivas a dosis muy bajas, y algunas de ellas incluso extremadamente tóxicas.<sup>3</sup> Un grupo especialmente importante de biotoxinas son las producidas por **cianobacterias**.

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos que originalmente fueron clasificados como algas debido a que contienen pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y pigmentos accesorios como ficocianinas, aloficocianinas y ficoeritrinas); son organismos muy versátiles, con capacidad para desarrollarse en ambientes tanto terrestres como acuáticos y en condiciones extremas de temperatura y salinidad. En condiciones normales forman parte del fitoplancton estacional típico en ríos, lagos y embalses. Sin embargo, cuando se presentan condiciones eutrofizantes, es decir, un enriquecimiento de las aguas superficiales en sustancias nutritivas como nitrógeno y fósforo, provenientes principalmente de desechos de fertilizantes y descargas de aguas residuales, junto con temperaturas elevadas, se rompe el equilibrio poblacional y se produce un incremento masivo de la población de

cianobacterias, pasando a ser la población dominante y generando problemas tanto de salud como ambientales. Estos fenómenos, conocidos en la literatura científica como floraciones o *blooms*, en terminología anglosajona, se consideran actualmente más frecuentes e intensos que antaño debido a la actividad humana y al calentamiento global.<sup>4</sup>

Se considera que existe un *bloom* cianobacteriano cuando las concentraciones celulares son del orden de 20,000 células por mililitro de agua. Estas proliferaciones son apreciables por un cambio en la apariencia de la superficie del agua, que pasa a tener un tono verdeazulado generado por los pigmentos fotosintéticos (ficobiliproteínas – azul y clorofilas a/b – verde) (**Figura 1.1**). Como consecuencia de la alta densidad poblacional y como una aparente estrategia ecológica ante la condición poblacional cambiante,<sup>i</sup> las cianobacterias producen una serie de metabolitos secundarios tóxicos conocidos como **cianotoxinas**.<sup>5,6</sup>



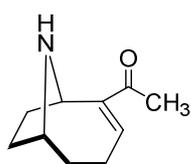
**Figura 1.1.** *Bloom* cianobacteriano en el lago Tai, en la provincia de Jiangsu, China, en octubre de 2007. (*Ecology of Cyanobacteria II*. Brian A. Whitton Editor, 2012).

Existen diferentes tipos de cianotoxinas que difieren entre sí tanto por su naturaleza química como por su acción tóxica (**Figura 1.2**).<sup>7</sup> Por su modo de acción se agrupan dentro de tres clases principales: *neurotoxinas* (anatoxina-a, anatoxina-a(S), saxitoxinas), *hepatotoxinas* (microcistinas, cilindrospermopsinas y

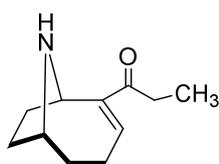
<sup>i</sup> En este sentido, algunas funciones putativas de las cianotoxinas parecen estar relacionadas con: (1) evitar el consumo de cianobacterias por el zooplancton y animales superiores; (2) inducir alteración de la estructura poblacional para ganar ventaja ecológica; y (3) actuar como mediadores químicos de señalización en procesos de alelopatía y quimiotaxis para establecer relaciones tróficas con otras cianobacterias u otros organismos.

nodularinas) y *dermatotoxinas* (lingbiatoxina A, aplisiatoxinas y lipopolisacáridos). Así mismo, atendiendo a su estructura química, las neurotoxinas generalmente son de naturaleza alcaloidea, mientras que las principales hepatoxinas presentan un sistema peptídico cíclico (aunque la cilindropermopsina es una guanidina cíclica de naturaleza alcaloide).

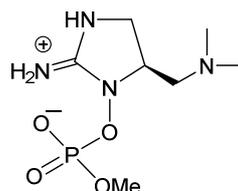
NEUROTOXINAS



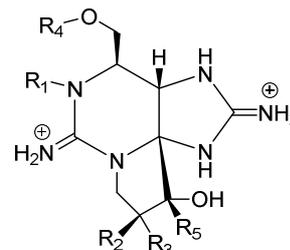
Anatoxina-a



Homoanatoxina-a

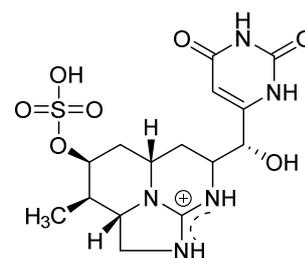
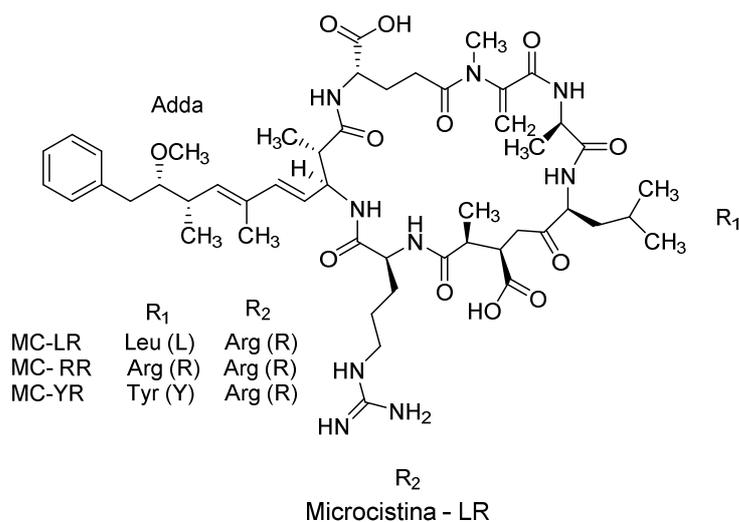


Anatoxina-a (S)



Saxitoxina

HEPATOTOXINAS



Cilindropermopsina

Figura 1.2. Estructura química de las principales cianotoxinas

Las principales vías de exposición de la población humana y animal a las cianotoxinas son la ingesta de agua contaminada, ya sea de forma intencionada (agua potable procedente de fuentes superficiales) o accidental (usos recreacionales y deportivos), y a través del consumo de suplementos dietéticos derivados de algas que no siempre cuentan con los controles adecuados y que pueden por tanto contener especies no deseadas de cianobacterias productoras de toxinas.<sup>8</sup> Una ruta de exposición que ha adquirido mayor relevancia en los últimos años y que por

tanto constituye un riesgo emergente es a través del consumo de pescado y moluscos bivalvos, procedentes tanto de la pesca tradicional como de piscicultura, que se han desarrollado en masas de agua afectadas por plagas de cianobacterias y que por tanto han estado expuestos a estas biotoxinas.<sup>9,10</sup>

Como ya se ha comentado, los *blooms* cianobacterianos se han tornado más frecuentes e intensos en la última década; así, el número de países donde se ha reportado la aparición de cianobacterias tóxicas, ya sea en agua continental o marina, no ha dejado de crecer. En el transcurso de los años, los casos de intoxicación de mayor impacto debido a que concluyeron en fatalidades o severos cuadros clínicos en un número significativo de personas, se han reportado en países como China, Portugal, Brasil y Australia.<sup>4,6</sup>

En Brasil existe constancia de dos casos de intoxicación humana por cianotoxinas. El primer caso que confirmó la muerte de seres humanos por intoxicación causada por cianotoxinas, ocurrió en 1988 en la región de Itaparica; se produjo una epidemia gastrointestinal con 2392 personas afectadas, de las que murieron 88, después de consumir agua contaminada con cianotoxinas producidas por *Anabaena spp.* y *Microcystis spp.*<sup>11</sup> Un segundo caso mortal, ocurrió en la ciudad de Caruarú en 1996, cuando 131 pacientes renales sufrieron una intoxicación venosa mientras realizaban el tratamiento de hemodiálisis; fallecieron 77 de ellos por fallo hepático.<sup>12,13</sup> A inicios de la década de 1980, la elevada incidencia de carcinomas hepáticos en determinadas zonas de China se atribuyó a la ingestión de agua contaminada con cianotoxinas provenientes de cianobacterias del género *Microcystis*.<sup>14</sup> En 1987 se documentó un episodio de intoxicación importante, por el número de personas afectadas con problemas gastrointestinales y dermatitis, en una población de Portugal abastecida con agua del Río Guadiana debido a la presencia de grandes concentraciones de *Aphanizomenon flos-aquae*.<sup>15</sup>

Más allá de la pérdida de vidas humanas, hay que señalar el elevado gasto ocasionado por la gestión del tratamiento del agua de reservorios destinados al consumo humano debido a problemas relacionados con la eutrofización y *blooms* de cianobacterias. En EE. UU. se estimó una pérdida económica anual de US\$2.2-4.6 billones, mientras que en Inglaterra y Gales la cifra estimada osciló entre

US\$105-160 millones.<sup>16</sup> En China, un intenso *bloom* en el lago Tai en el año 2007 costó más de US\$16.25 billones,<sup>17</sup> mientras que en EE. UU. el programa de análisis y gestión de *blooms* peligrosos de algas (Harmful Algal Blooms o HABs, por sus siglas en inglés) contó con un presupuesto de US\$50 millones al año entre 1987 a 1992, y desde entonces las partidas presupuestarias asignadas se han incrementado año tras año.<sup>18</sup>

En la última década, una parte importante de la asignación de presupuestos por parte de la *US Environmental Protection Agency* (USEPA) se ha dirigido a tres de las cianotoxinas que se consideran de mayor relevancia y toxicidad, y que por tanto requieren de una monitorización más vigilante y de estudios adicionales que permitan conocer mejor su impacto sobre la salud de las personas, el bienestar animal y el estado de los ecosistemas. Estas cianotoxinas son la microcistina-LR, la cilindrospermopsina y la anatoxina-a.<sup>19</sup>

### 1.1. Anatoxina-a

La **anatoxina-a** (2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno), una amina secundaria bicíclica, es considerada una de las cianotoxinas más tóxicas de las que se pueden encontrar en agua dulce.<sup>20</sup> El primer caso confirmado de intoxicación por anatoxina-a se produjo en Canadá en los años 60, donde causó la muerte de ganado vacuno. En aquel momento, debido a su elevada toxicidad, se denominó a la sustancia causante todavía no identificada como *Very Fast Death Factor*, debido a que inyectada intraperitonealmente en ratones éstos morían en menos de 5 minutos.<sup>21</sup> La elevada potencia de anatoxina-a como neurotoxina (LD<sub>50</sub> intraperitoneal en ratones: 250 µg/kg) se debe a que es un agonista de la acetilcolina, uniéndose de forma irreversible al receptor nicotínico de acetilcolina a nivel neuromuscular, lo que bloquea el canal de sodio e impide la repolarización de la membrana, causando sobreestimulación muscular que provoca convulsiones, parálisis y finalmente la muerte por parada cardiorrespiratoria (**Figura 1.3**).<sup>22</sup>

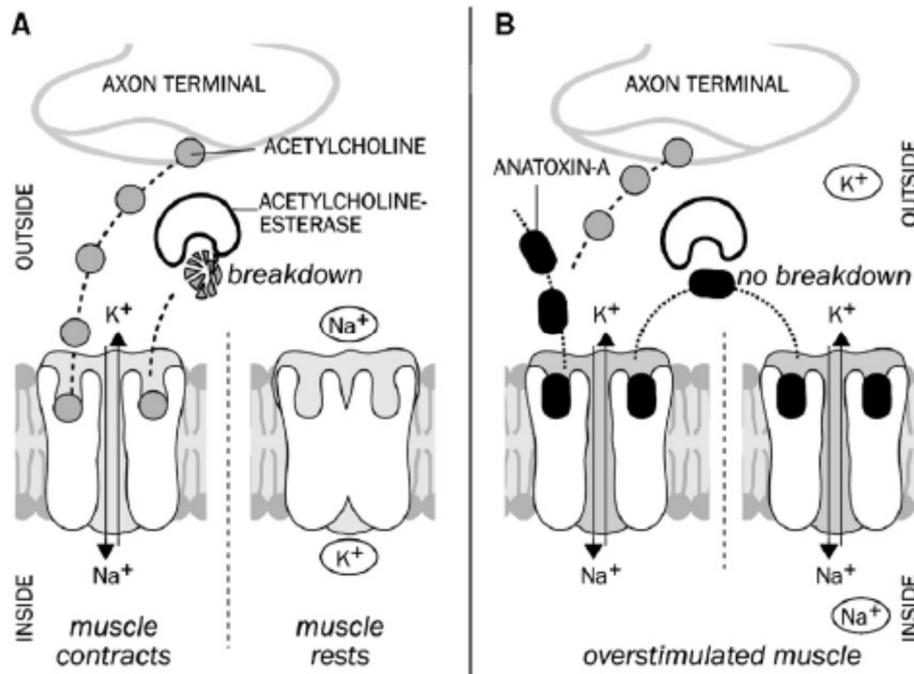


Figura 1.3 Modo de acción de la anatoxina-a (tomada de Osswald *et al.*, 2007)

Las especies de cianobacterias de aguas continentales (dulce y salobre) que a nivel mundial se relacionan más frecuentemente con la producción de anatoxina-a se encuentran incluidas en los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermum* y *Nodularia*.<sup>23</sup> En condiciones naturales, la concentración de anatoxina-a disuelta en el agua liberada por estos microorganismos suele ser muy baja, entre 0.1 y 10  $\mu\text{g/L}$ . Sin embargo, estos valores tienden a incrementarse cuando el *bloom* envejece o empieza a declinar. Así pues, la liberación de la toxina parece ocurrir principalmente, si no exclusivamente, durante la senescencia, muerte y lisis celular, más que por excreción continua al entorno.

Se han documentado gran cantidad de casos fatales debidos a intoxicaciones por anatoxina-a en animales domésticos, ganado y fauna salvaje como consecuencia de la ingesta de aguas contaminadas.<sup>24,25</sup> En algunos casos, se han llegado a registrar concentraciones superiores a 1  $\text{mg/L}$  de anatoxina-a libre, un valor al menos 100 veces superior al recomendado por diferentes organismos oficiales.<sup>26</sup> El caso quizás más llamativo de entre los más recientes se documentó en noviembre del 2013, y consistió en la muerte repentina de más de 100 alces

cerca de un abrevadero artificial, en un área rural de una pequeña localidad de Las Vegas, New Mexico.

A pesar de que aún no se ha documentado ningún evento mortal en humanos por ingestión de anatoxina-a, el riesgo potencial es elevado, sobre todo para poblaciones como las ubicadas en la zona del Medio Oeste y Grandes Lagos de EE. UU,<sup>27</sup> así como en algunas regiones de Nueva Zelanda, Francia, Alemania y Australia, en donde la anatoxina-a es la biotoxina encontrada con más frecuencia y a concentraciones más elevadas.<sup>28,29</sup> Existen evidencias considerables de intoxicaciones en seres humanos por la ingesta accidental de esta cianotoxina que han terminado en cuadros clínicos incapacitantes, principalmente por bañistas<sup>30</sup> y personas que realizan actividades recreativas en lagos y ríos,<sup>31,32</sup> incluso hay zonas donde el problema es recurrente y se repite cada año. A modo de ejemplo, el pasado mes de Mayo dos lagos en Norteamérica (Anderson y Lawrence) debieron permanecer cerrados al público por niveles inadmisibles de anatoxina-a.<sup>33</sup>

Debido a la ausencia de estudios toxicológicos rigurosos, son pocos los países que han establecido regulaciones sobre los niveles máximos permisibles de anatoxina-a en aguas. En EE. UU., algunos estados han adoptado como valor provisional de referencia 1 µg/L como nivel máximo aceptable de esta cianotoxina en aguas de abastecimiento público, y de 75 µg/L en aguas de uso recreativo.<sup>34</sup> En otros países, como Canadá y Nueva Zelanda, consideran como valores guía de seguridad concentraciones de anatoxina-a en agua potable de 3.7 y 6.0 µg/L, respectivamente.<sup>26</sup>

En cuanto a la regulación de la presencia de anatoxina-a en alimentos, una vía de exposición emergente, son muy pocos los países donde existe algún tipo de legislación. En EE.UU., sólo California proporciona valores guía de seguridad de cianotoxinas en pescado para consumo humano, y establece como margen de seguridad una concentración de anatoxina-a de 1100 ng/g (peso húmedo) como límite máximo recomendado.<sup>35</sup> En Europa, países como Dinamarca, Francia o Grecia recogen la presencia de microcistina como la toxina representante del grupo de cianotoxinas, aunque las concentraciones máximas propuestas son diferentes en cada país.<sup>36</sup>

## 1.2 Características estructurales de anatoxina-a

En 1977, Devlin y su equipo determinaron la estructura química del *Very Fast Death Factor* a través de análisis cristalográficos y de rayos X, asignándole el nombre de anatoxina-a. Se determinó que su fórmula molecular era  $C_{10}H_{15}NO$ , y que tenía un peso molecular de 165.26 g/mol. En estudios posteriores se determinó que de las dos formas enantioméricas, únicamente (+)-anatoxina-a se produce en la naturaleza, y que toxicológicamente es aproximadamente 150 veces más potente que el enantiómero levógiro.

Estudios adicionales conducidos por el equipo de Rapoport, a inicios de los años 80, determinaron que la anatoxina-a presenta un  $pK_a=9.4$ , lo que indica que la molécula se encuentra principalmente en forma catiónica a pH fisiológico o en la mayoría de aguas naturales.<sup>37</sup> La molécula presenta dos centros asimétricos, en  $C1^*$  y  $C6^*$ , y dos arreglos conformacionales, *s-cis* y *s-trans*, asociados con la libre rotación del enlace en  $C2$  y  $C10$  con igual ratio de población de ambas formas en disolución a temperatura ambiente, aunque en forma cristalina parece prevalecer el conformero *s-trans* ( $\Delta E=3.4$  KJ/mol) (Figura 1.4).<sup>37</sup>

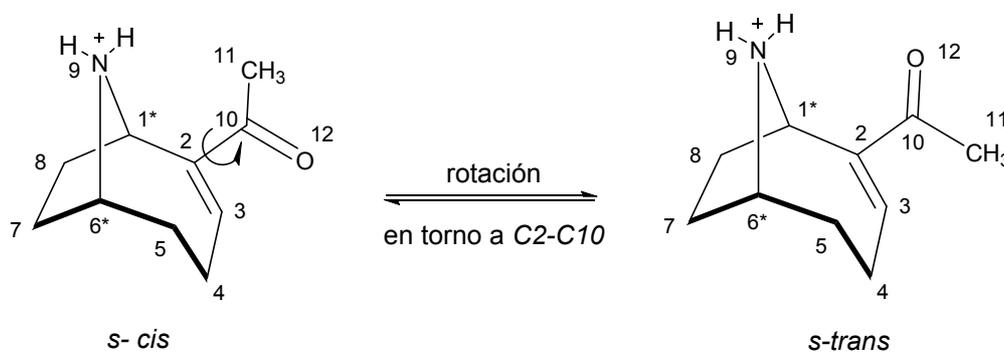


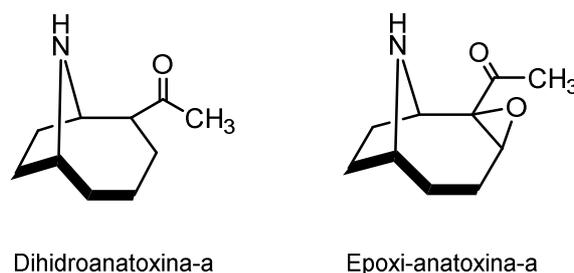
Figura 1.4 Relación conformacional *s-cis* y *s-trans* de anatoxina-a

La libre rotación señalada resulta no ser significativa para la conformación adoptada por el biciclo, el cual adopta conformación de silla torcida apuntando  $C4$  hacia abajo para el anillo de siete miembros, mientras que el anillo pirrolidínico se dobla de manera que el nitrógeno es empujado hacia atrás acercándolo al puente etánico  $C7-C8$  (la distancia de  $N9$  y el plano  $C6-C7-C8-C1$  es 0.57 Å). Finalmente, todo este rearrreglo estructural se traduce, en la caracterización espectroscópica de

la molécula, en complejos patrones de acoplamiento en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .<sup>ii,37</sup>

### 1.3 Estabilidad de anatoxina-a

El primer estudio sobre la estabilidad de la anatoxina-a se realizó al objeto de conocer cómo esta neurotoxina podría eliminarse bajo cuatro posibles rutas naturales de degradación: dilución, adsorción, fotólisis y degradación no fotoquímica (principalmente por efectos oxidativos en presencia de sales de  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ ). Los resultados indicaron que la anatoxina-a es muy inestable en condiciones naturales; por acción de la luz solar y pH alto se degrada parcial o totalmente en alcaloides más estables y no tóxicos como la dihidroanatoxina-a y la epoxianatoxina-a (**Figura 1.5**).<sup>38</sup> También se concluyó que la fotodegradación de la molécula es independiente del oxígeno; no obstante, la intensidad de la luz solar y el pH sí influyen, y lo hacen de manera lineal.



**Figura 1.5.** Alcaloides de degradación de anatoxina-a

Debido a que mayoritariamente, al igual que ocurre con otras cianotoxinas, la anatoxina-a se encuentra retenida en el interior celular durante la etapa de crecimiento del *bloom* cianobacteriano, su estabilidad permanece prácticamente inalterada. Cuando las células mueren o se rompen, la toxina se libera en el agua, y es entonces cuando los factores fisicoquímicos del medio pueden afectar a dicha estabilidad. Según los primeros estudios, la anatoxina-a libre posee un tiempo de vida media de menos de un día.<sup>39</sup> Sin embargo, trabajos posteriores señalaron que

<sup>ii</sup> Para detalles de los desplazamientos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento ( $J$ ) de RMN  $^1\text{H}$  de la molécula de anatoxina-a, en la sección de Anexos se incluye una tabla completa de la caracterización espectroscópica.

la vida media de anatoxina-a a pH 8-10 es de aproximadamente 14 días bajo condiciones de fotoperiodos naturales.<sup>40</sup>

Dada la ambigüedad de los resultados encontrados, el grupo de Kaminski<sup>41</sup> retomó recientemente el tema ensayando factores como pH, temperatura, luz e irradiación UV-B. Estos estudios confirmaron la dependencia de la estabilidad de anatoxina-a con el pH, pero señalan que la biotoxina es relativamente estable a temperatura ambiente. La acidificación tiende a estabilizar a la molécula, mientras que la alcalinización promueve su degradación en el plazo de días y no de horas, como se suponía inicialmente. En muestras acidificadas por debajo de pH 3, sólo se observó una ligera disminución de la concentración inicial después de 9 semanas ( $\leq 3\%$ ); mientras que a pHs comprendidos entre 7 y 9.5 se encontró una reducción de la concentración inicial de anatoxina-a en torno al 52% y 63%, respectivamente, a temperatura ambiente ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) después de 60 días.

Respecto al efecto de la temperatura, se encontró que la degradación de la anatoxina-a en medio acuoso se acelera a partir de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y es máxima a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, la tasa de descomposición alcanza un 76% y un 83% a pH 7 y 9.5, respectivamente. Estos ratios de degradación por efecto de temperatura/pH se atribuyen a un proceso de desprotonación del nitrógeno puente en la molécula.<sup>42</sup>

Por otro lado, estudios también llevados a cabo por el grupo de Kaminski demostraron que en muestras de anatoxina-a irradiadas con lámparas que mimetizan la luz solar, la tasa de degradación de la biotoxina es muy baja (3%) respecto al control, incluso a pH 9.5, lo que contrasta con los primeros informes sobre estabilidad de la anatoxina-a, donde se proponía que la toxina es lábil bajo la luz solar a pH elevado, con una vida media de 1-2 horas por efecto de degradación fotoquímica. En cambio, cuando muestras que contenían anatoxina-a fueron irradiadas directamente con luz UV-B, se observó una intensa degradación, incluso a pH ácido, siendo dicha degradación dependiente de la intensidad de la irradiación.

A nivel de laboratorio, para el uso rutinario y manejo del material de referencia de anatoxina-a en disolución acuosa, los estudios sugieren que la molécula es

estable durante más de cuatro meses cuando se mantiene en la oscuridad, a pH 6 y a una temperatura de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>21</sup> The National Research Council (NRC) de Canadá, institución que proporciona material de referencia certificado de (+)-anatoxina-a a una concentración de  $30\text{ }\mu\text{M}$  en disolución metanol/agua (9:91, v/v) con 0.01% de ácido acético, sugiere que la estabilidad de la molécula en estas condiciones es superior a un año si se conserva a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad; cuando se almacena a  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  la descomposición es inferior al 3% después de un año, y menor del 2% a  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  después de 10 días.<sup>43</sup>

Desde la perspectiva del control de la anatoxina-a y de otras neurotoxinas en diferentes masas de aguas, las cuestiones relacionadas con la estabilidad han supuesto sin duda una dificultad importante en la implementación o mejora de los procedimientos analíticos para su determinación, factores que han repercutido directamente en la disponibilidad de estándares analíticos comerciales o de materiales de referencia para la validación de los ensayos.

#### **1.4 Métodos de análisis de anatoxina-a**

Del grupo de biotoxinas de origen cianobacteriano, la anatoxina-a fue la primera en ser estructuralmente elucidada. Desde entonces, los métodos analíticos para su identificación se han diversificado y mejorado notablemente, constituyéndose en una de las principales herramientas con las que cuentan las autoridades competentes para garantizar la seguridad de los ciudadanos. Las técnicas para la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos son fundamentalmente de dos tipos: cromatográficas y de reconocimiento molecular.

##### **1.4.1 métodos cromatográficos**

Gracias a la combinación de lechos y columnas con mayor resolución, equipos con mejores prestaciones y generalmente automatizados, y al desarrollo de detectores cada vez más potentes, se puede afirmar que los métodos cromatográficos se han erigido justamente en la metodología de referencia. Se trata de técnicas potencialmente capaces de determinar varios analitos simultáneamente, con una gran sensibilidad, selectividad y reproducibilidad, y que no tienen parangón como métodos de confirmación cuando se acoplan a espectrometría de masas. En

el caso de las biotoxinas, debido al carácter polar de la mayoría de ellas, la cromatografía líquida se utiliza más ampliamente como método de separación que la cromatografía de gases. En la **tabla 1.1** se muestran algunas referencias bibliográficas en las que se emplean técnicas analíticas cromatográficas para la determinación de anatoxina-a.

**Tabla 1.1.** Técnicas cromatográficas para la detección y cuantificación de anatoxina-a

Método analítico	Matriz	LOD/LOQ	Preparación de la muestra	Referencia
HPLC-FLD	Agua	0.2/0.58 µg/L	WCX SPE	44
	Pescado	80/170 ng/g		
GC-MS	Agua	5-7 µg/L	MCX SPE	45
	Agua	2 ng/mL	SPME	47
CZE+MEKC	Cianobacteria	1-4 µg/mL	Extracto crudo	46
MALDI-TOF	Agua	Solo detección	Sin tratamiento	47
LC-MS/MS	Agua	< 0.5 µg/L	MCX SPE	41
UPLC-MS/MS	Agua	1.9/5.0 ng/mL	Filtración + concentración	29

*FLD* fluorescence detection, *UV* ultraviolet, *PDA* photo-diode array, *CZE* capillary-zone electrophoresis, *MEKC* micellar electrokinetic chromatography, *SPE* solid phase extraction, *SPME* solid-phase microextraction, *WCX* weak cationic exchange, *MCX* mixed cationic exchange.

A pesar de las excelentes prestaciones de los modernos equipos cromatográficos, la anatoxina-a es un analito particularmente difícil de analizar. Debido a su carácter polar, pequeño tamaño y ausencia de grupos fluorescentes, una de las estrategias analíticas más utilizadas implica la derivatización de anatoxina-a.

El agente derivatizante utilizado con mayor frecuencia es el 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxodiazol (NBD-F).<sup>48,49,50</sup> La reacción se desarrolla bajo un sencillo protocolo de reacción en medio básico de tampón borato y un tiempo de reacción de 10 minutos. El método proporciona un LOD de 10 ng/L y, además, el producto derivatizado alcanza un peso molecular de 328 g/mol, lo que posibilita su medición por HPLC-MS. Otros procesos de derivatización incluyen la utilización de derivados quinolínicos como el carbamato de 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidilo (AQC)<sup>51</sup> (HPLC-FLD), el hexilcloroformiato (HCF)<sup>52</sup> (SPME-GC-MS), el cloruro de dansilo (DNS-Cl)<sup>45</sup> (HPLC-MS), el *N*-butilo (LC-MS y GC-MS),<sup>53</sup> y el 9-fluorenil-metilcloroformiato (Fmoc) (LC-ESI-MS),<sup>54</sup> entre otros.

Debido a su elevada sensibilidad, algunas técnicas como HPLC-MS/MS no requieren derivatizar la biotoxina; sin embargo, incluso esta potente técnica no está exenta de problemas en el caso de la anatoxina-a, siendo el más importante la existencia de sustancias con patrones de fragmentación semejantes a los de la biotoxina. En este sentido, el ejemplo mejor documentado es el aminoácido fenilalanina, que presenta características cromatográficas de retención similares a la anatoxina-a, tiene la misma masa molecular y un idéntico patrón de fragmentación de iones isobáricos en el espectro MS/MS, factores que condujeron a que esta metodología no fuera capaz de discriminar entre la anatoxina-a y el aminoácido en un caso forense atribuido presuntamente a intoxicación por anatoxina-a.<sup>55</sup> En todo caso, la técnica de HPLC-MS/MS es sin duda el procedimiento más sensible y más ampliamente aceptado, y el utilizado por la USEPA como método oficial.<sup>56</sup> Existe no obstante un amplio consenso sobre la necesidad de disponer de métodos analíticos rápidos y fiables que permitan gestionar eficientemente las crisis que se producen, evitando daños sobre la salud humana y los ecosistemas. En este sentido, los métodos biológicos o bioquímicos basados en el reconocimiento molecular se postulan como métodos analíticos potentes que facilitarían la toma de decisiones en situaciones de prevención y contingencia sanitaria.

#### **1.4.2 métodos de reconocimiento molecular**

Las técnicas basadas en la utilización de receptores, ya sean éstos aptámeros, polímeros de impresión molecular, proteínas de membrana y muy especialmente anticuerpos, se consideran la mejor opción cuando es necesario realizar un elevado número de análisis en poco tiempo y/o en entornos poco dotados técnicamente (técnicas de cribado o *screening*). Los métodos inmunoanalíticos se basan en la unión selectiva, reversible y no covalente entre la sustancia a detectar (analito) y un anticuerpo que la reconoce con una elevada afinidad. Dependiendo de la finalidad analítica, los anticuerpos se pueden adaptar a diferentes formatos, tales como columnas de inmovilización, ensayos de flujo lateral y tiras inmunorreactivas, biosensores, *microarrays*, y muy especialmente ensayos tipo ELISA.

---

### 1.4.2.1 inmunoensayos tipo ELISA

La técnica conocida como ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es un tipo de inmunoensayo caracterizado porque la señal es generada por una enzima y porque uno de los inmunorreactivos participantes (anticuerpo o antígeno) se encuentra inmovilizado sobre un soporte, mayoritariamente una placa multipocillo de poliestireno. Desde la aparición de esta metodología en 1971,<sup>57,58</sup> gracias a investigaciones complementarias llevadas a cabo por diferentes grupos sobre la inmovilización de anticuerpos y su marcaje con enzimas,<sup>59,60</sup> se han desarrollado ELISAs para una enorme cantidad y variedad de antígenos, incluyendo contaminantes y residuos relevantes en alimentos y en aguas. En particular, los ELISAs dirigidos a la detección de biotoxinas gozan de gran implantación en laboratorios de todo el mundo, e incluso se recomienda su uso desde instancias oficiales con competencias reguladoras. Buena prueba de ello es el gran número de empresas de inmunodiagnóstico que comercializan ensayos tipo kit para la detección de biotoxinas de todo tipo (Abraxis, Beacon, Biosense, Envirologix, Enzo, Bioscientific, r-Biopharm, RomerLabs,...).

En este sentido, de las tres cianotoxinas prioritarias incluidas en la *Safe Drinking Water Act (SDWA)* de la USEPA (microcistina-LR, cilindrospermopsina y anatoxina-a), la única para la que hasta la fecha no hay disponible comercialmente un método inmunoanalítico que permita su determinación, es la anatoxina-a. Obviamente, esto no se debe a una falta de interés por parte de grupos de investigación y de empresas inmunotecnológicas. De hecho, la obtención de anticuerpos fiables para esta biotoxina es un objetivo largamente perseguido, como atestigua el que organismos gubernamentales de EE.UU., como la US Army y la USEPA, hayan financiado proyectos con este propósito.<sup>61,62</sup> Probablemente se debe más bien a que la anatoxina-a es una molécula extremadamente pequeña y muy poco compleja estructuralmente, al tiempo que poco estable, lo que en principio dificulta considerablemente la generación de anticuerpos con las prestaciones adecuadas.

Ya en 2005, en un simposio sobre cianotoxinas, se identificó como línea de investigación prioritaria el desarrollo de un ELISA para anatoxina-a, objetivo que

sigue estando vigente 10 años después.<sup>63</sup> Lo más cercano a un método inmunoanalítico desarrollado hasta la fecha es un ensayo basado en la utilización del receptor de acetilcolina procedente de membranas de electrocitos de la raya eléctrica (*Torpedo sp.*).<sup>64</sup> Existe un kit comercializado por Abraxis basado en este procedimiento, si bien su sensibilidad no parece suficiente, y desde luego se encuentra lejos de las exhibidas por ELISAs comerciales para otras cianotoxinas.<sup>17</sup> El único intento documentado en la literatura científica de sintetizar un análogo funcionalizado de la anatoxina-a con vistas a generar anticuerpos fue publicado en 2009, aunque los autores no demostraron haber conseguido el objetivo perseguido, ni tampoco dicho trabajo tuvo continuidad posteriormente.<sup>65</sup>

A la vista de todo lo expuesto, consideramos como un objetivo científico-tecnológico relevante la generación de anticuerpos capaces de reconocer a anatoxina-a con una adecuada afinidad y especificidad, con vistas al desarrollo de métodos inmunoquímicos que permitan la determinación de esta biotoxina en aguas y en aquellos alimentos en donde pueda estar presente. En las siguientes secciones se revisan brevemente los fundamentos científicos y estrategias habituales en el desarrollo de inmunoensayos para analitos de bajo peso molecular.

### **1.5 Obtención de anticuerpos hacia anatoxina-a**

La disponibilidad de anticuerpos de alta afinidad y selectividad hacia el analito de interés es el elemento clave para el desarrollo de un inmunoensayo. Para obtener estas biomoléculas se siguen directrices bien definidas avaladas por su aplicación durante más de tres décadas. En general, las etapas involucradas se pueden organizar como sigue:<sup>66</sup>

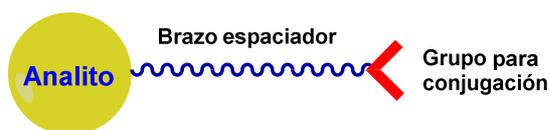
1. Síntesis de haptenos
2. Preparación de conjugados proteicos
3. Producción de anticuerpos
4. Caracterización de anticuerpos

### 1.5.1 Síntesis de haptenos, la etapa determinante

Las moléculas de bajo peso molecular (<1000 g/mol) reciben, desde un punto de vista inmunológico, la denominación de haptenos; es decir, son moléculas que por su tamaño pequeño sólo poseen un determinante antigénico, por lo que pueden interactuar con algún anticuerpo preexistente, pero son incapaces de desencadenar por sí mismas una respuesta inmune, a menos que se acoplen a una molécula de mayor entidad, como una proteína.<sup>67</sup> Tal es el caso de la anatoxina-a, con un peso molecular de 165 g/mol. En consecuencia, para obtener anticuerpos frente a anatoxina-a es necesario acoplar la molécula covalentemente a una proteína, de manera que el conjugado resultante, al emplearlo como inmunógeno, sí desencadenará una respuesta inmunitaria.

En el contexto de los inmunoensayos para moléculas orgánicas de este tipo, y dada la habitual ausencia de grupos reactivos en la molécula diana, el término hapteno se emplea también para designar a un compuesto sintético que mimetiza la estructura química del analito de interés y que al mismo tiempo permite el acoplamiento a una proteína. Por lo tanto, el hapteno es el que permite la obtención de anticuerpos capaces de reconocer al analito, gracias a la similitud estructural entre ambos.

Para el acoplamiento (conjugación), es necesario que el hapteno posea grupos funcionales, tales como  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  o  $-\text{SH}$ , capaces de reaccionar con alguno de los grupos disponibles en las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas portadoras. Adicionalmente, es preferible que este grupo funcional se encuentre separado de la estructura del analito por un brazo espaciador, cuya función principal es la de distanciar espacialmente el hapteno de la proteína, evitando así el enmascaramiento parcial o total del hapteno por proximidad al sitio de unión con la proteína (**Figura 1.6**). Ahora bien, dado que la mayoría de las cianotoxinas carecen de alguno de los grupos funcionales mencionados, o si lo tienen por lo general conviene no modificarlo, el primer paso para la obtención de anticuerpos específicos es la síntesis de derivados funcionalizados del analito que incorporen alguno de los grupos funcionales señalados.



**Figura 1.6.** Representación esquemática de un hapteno funcionalizado

Con frecuencia, el brazo espaciador consiste en una cadena hidrocarbonada totalmente saturada con un grupo carboxilo terminal; a través de este último se realiza el acoplamiento con la proteína gracias a la eventual facilidad de reaccionar con los grupos amino libres de los aminoácidos básicos, principalmente lisinas, de las proteínas portadoras a través de la formación de un enlace amida. Es importante que el brazo espaciador no contenga elementos fuertemente inmunogénicos por sí mismos, como son anillos aromáticos, dobles enlaces conjugados o heteroátomos, ni sea excesivamente polar, lo que podría cambiar la distribución electrónica de la molécula y desviar la respuesta inmunitaria hacia el brazo espaciador en lugar de hacia la estructura del analito.<sup>68,69</sup>

En cuanto a la longitud del brazo espaciador, se suele admitir que un brazo de tamaño medio (4-6 átomos de carbono) favorece la exposición del hapteno al sistema inmune, lo que desemboca en la producción de anticuerpos con la deseada afinidad y especificidad por el analito de estudio. Existen casos descritos que prueban que conjugados inmunogénicos con longitudes de brazos espaciadores mayores o menores dan lugar a peores anticuerpos, aunque no a la imposibilidad de obtenerlos.<sup>70,71</sup>

El hapteno que se desee sintetizar debe poseer una estructura lo más parecida posible al analito, preservando los principales grupos de la molécula, la distribución electrónica y las propiedades hidrofóbicas de la molécula original.<sup>72</sup> De esta manera, resulta lógico suponer que si el hapteno es muy similar al analito, los anticuerpos generados hacia dicho hapteno deberán reconocer también al analito con elevada afinidad y especificidad. No obstante, existen ejemplos en los que se han generado anticuerpos a partir de haptenos fragmentarios, es decir, aquéllos que solamente representan parte de la molécula original.<sup>73,74</sup>

La síntesis de haptenos, considerada como una etapa crítica en la obtención de anticuerpos, no siempre resulta fácil, y con frecuencia es necesario recurrir a estrategias que implican síntesis total, lo que conlleva en ciertos casos un esfuerzo experimental considerable.<sup>75</sup> La aproximación más extendida para evitar la síntesis total ha sido introducir la cadena en la posición de la estructura del analito que resultaba más simple desde el punto de vista sintético, mediante conexiones viables y en las posiciones más accesibles;<sup>76</sup> llegando a aprovechar la presencia de grupos funcionales presentes en el analito para introducir directamente la cadena hidrocarbonada sin la necesidad de sintetizar el compuesto.<sup>77,78</sup> Sin embargo, este tipo de aproximación puede dar lugar a estructuras poco apropiadas para la obtención de anticuerpos muy afines, al modificar electrónicamente y estéricamente la molécula original, o bien por enmascarar algún grupo funcional importante para el reconocimiento.

#### 1.5.1.1 Estrategias de síntesis para anatoxina-a y análogos estructurales

Es evidente que la preparación de derivados funcionalizados de anatoxina-a debe tomar como punto de partida la experiencia acumulada en la síntesis de la propia molécula y de otros análogos estructurales. En este sentido, cabe señalar que la química descrita para anatoxina-a se ha generado, en gran medida, debido al importante papel que desempeñó esta biotoxina para caracterizar las propiedades de los receptores de acetilcolina en el sistema nervioso. Otras contribuciones adicionales se han producido por la necesidad de desarrollar métodos analíticos sensibles para la detección de esta toxina en aguas.

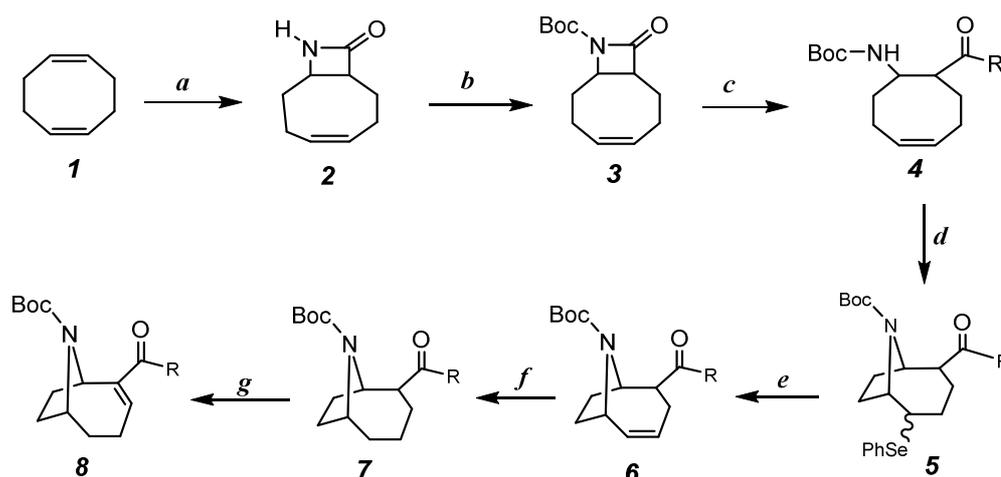
Hasta la fecha se han publicado dos revisiones sobre aproximaciones sintéticas para la preparación de anatoxina-a, una que cubre las investigaciones realizadas hasta 1996,<sup>79</sup> y otra que incluye hasta 2005.<sup>80</sup> En el presente trabajo sólo se presentarán aquellas estrategias sintéticas más destacadas por su relevancia para los objetivos del presente trabajo. Adicionalmente, aunque las síntesis planteadas por expansión del anillo de tropano de la (-)-cocaína poseen poco valor práctico por la accesibilidad limitada de su precursor, resultan interesantes por incluir etapas de síntesis que pueden resultar de interés para la obtención de haptenos de

anatoxina-a. De igual manera, se incluyen algunas de las pocas estrategias reportadas para la síntesis de homoanatoxina-a y los principales productos de degradación.

### 1.5.1.1.1 Apertura de $\beta$ -lactamas

En el año 2000, Parsons y cols.<sup>81</sup> publicaron la utilización de anillos de  $\beta$ -lactamas como material de partida para obtener la anatoxina-a y derivados estructurales de la misma (Esquema 1.1).<sup>iii</sup> La apertura del anillo  $\beta$ -lactámico 2, seguido de una ciclación transanular para construir el esqueleto azabicíclico, fue la estrategia utilizada.

La síntesis involucró una cicloadición del clorosulfonilisocianato con el ciclooctadieno 1 de partida, que generó el anillo de la  $\beta$ -lactama 2, cuya amina se protegió posteriormente con Boc para generar el derivado *N*-Boc protegido 3.



**a.** (1)  $\text{CS}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anh, DCM,  $0^\circ\text{C}$ , (2)  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  **b.**  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP, t.a., 6h **c.**  $\text{RMgBr}$ ,  $-40^\circ\text{C}$ , THF **d.**  $\text{PhSeCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , MeCN, t.a., 16 h **e.**  $\text{H}_2\text{O}_2$ , THF  $0^\circ\text{C}$  **f.**  $\text{H}_2$ , Pd/C, MeOH, 1h **g.** NaH, THF, TBDMSCl, MeOH,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , MeCN.

Esquema 1.1

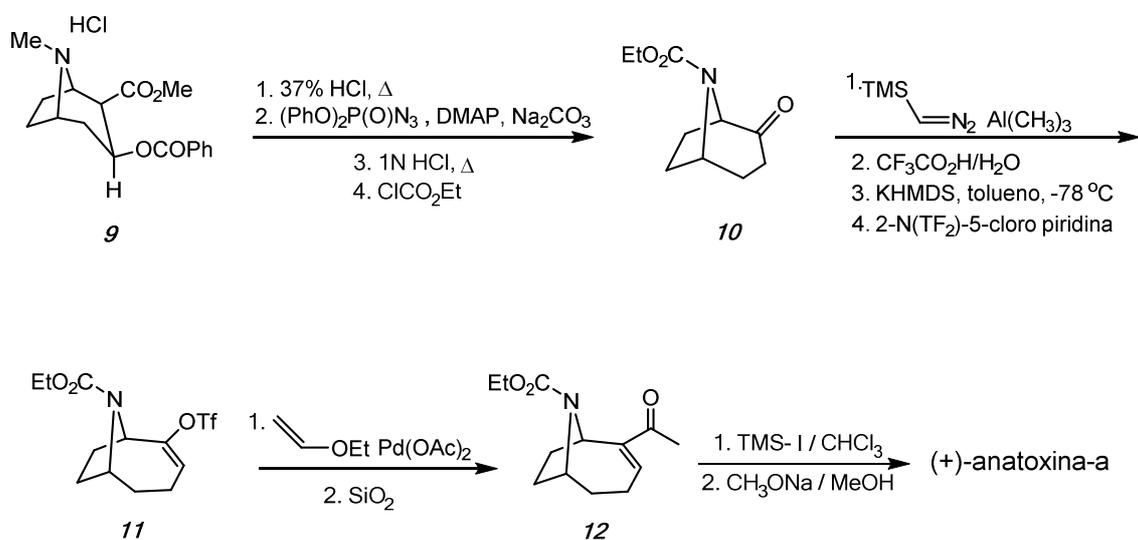
Posteriormente, la apertura del anillo lactámico con una variedad de nucleófilos en forma de reactivos de Grignard les permitió acceder a 4, que seguido de una ciclación electrofílica mediada por selenio proporcionó el esqueleto azabicíclico 5. Con la oxidación consecutiva generaron 6, y por medio de una hidrogenación catalítica accedieron al intermedio 7, que les proporcionó el esqueleto de la

<sup>iii</sup> La numeración de las diferentes estructuras químicas de este apartado introductorio es independiente de aquéllas que aparecen en los otros apartados de esta memoria.

anatoxina  $\delta$  portando varios tipos de cadenas laterales. Finalmente, mediante un tratamiento reportado por Sardina y cols.<sup>82</sup> y un intermedio enolsililéter, se consigue la anatoxina-a y una serie de análogos estructurales variables en el grupo de la enona.

### 1.5.1.1.2 Expansión de anillos del tropano

Especialmente interesante resulta la estrategia presentada por Weggey cols. para la obtención enantiomérica de (+)-anatoxina-a en ocho etapas con un rendimiento global del 26% (Esquema 1.2).<sup>83</sup>

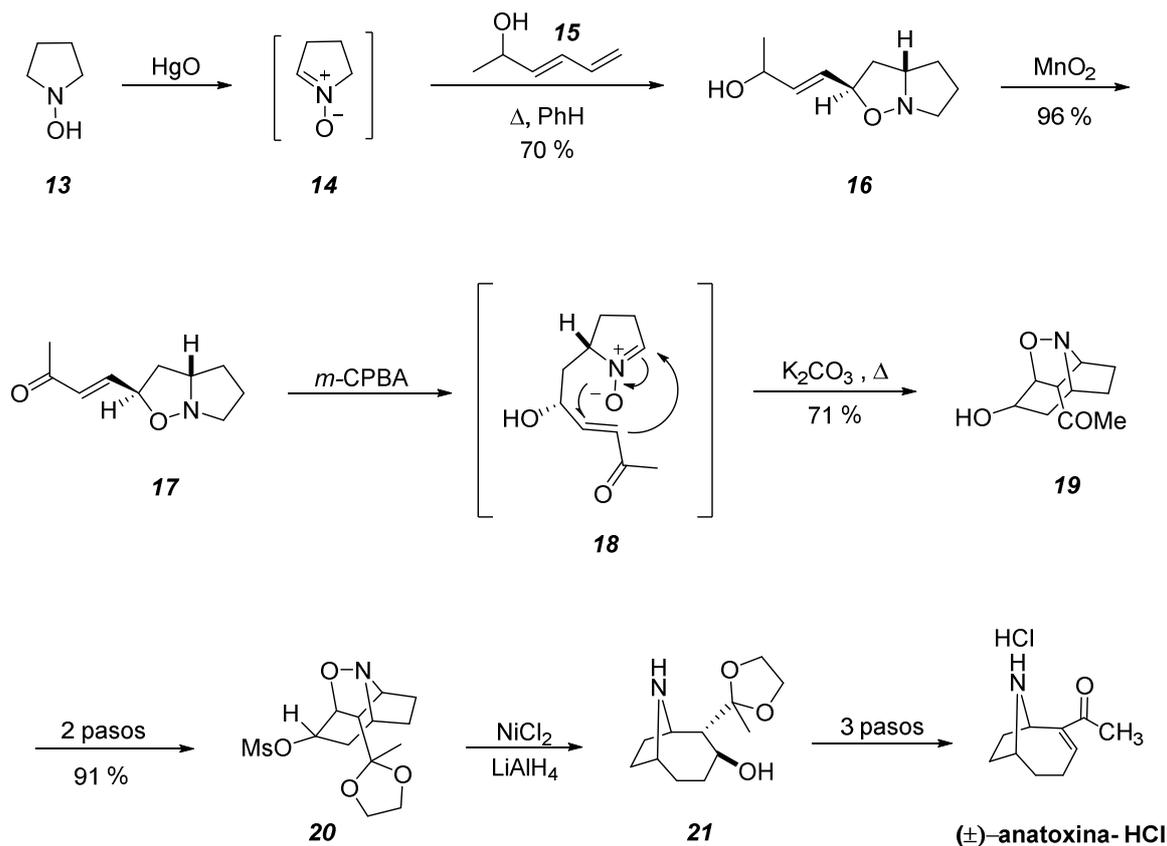


Esquema 1.2

La degradación del clorhidrato de (-)-cocaína **9**, de estereoquímica definida, proporcionó la (+)-2-tropinona **10**, que se trató con cloroformiato de etilo para proteger el átomo de nitrógeno. La expansión del anillo se realizó de manera enantioselectiva utilizando diazometiltrimetilsilano en presencia de ácido de Lewis. Una vez expandido el anillo, se trató con KHMDS y 2-N(TF<sub>2</sub>)-5-cloro-piridina para formar el triflato **11** con la insaturación característica del producto natural. Bajo condiciones suaves se realizó una reacción de acoplamiento de Heck, generando la enona **12** con rendimientos altos. La desprotección final de la amina empleando iodo-trimetilsilano en  $\text{CHCl}_3$  permitió obtener la (+)-anatoxina-a con un rendimiento del 89%.

## 1.5.1.1.3 Cicloadiciones de nitronas

En 1984, Tufariello y cols. propusieron la síntesis de anatoxina-a racémica a partir de una 1-hidroxipirrolidina (**13**) aplicando una serie de reacciones de cicloadición de nitronas.<sup>84,85</sup> La oxidación de **13** dio lugar a la formación de la nitrona **14**, que de manera secuencial se llevó a una reacción de cicloadición dipolar con el alcohol 3,5-hexadien-2-ol **15** (Esquema 1.3).



Esquema 1.3

La oxidación alílica del *N,O*-acetal bicíclico **16** resultante produjo la enona **17** como único producto de reacción, lo que les sugirió que la reacción procedía bajo una ciclación *exo* selectiva entre **14** y **15**. El tratamiento de **17** con ácido *meta*-cloroperoxibenzoico (*m*-CPBA) resultó en la ruptura oxidativa del *N,O*-acetal para generar la nitrona **18**, que secuencialmente se llevó a una ciclación intramolecular selectiva promovida térmicamente para proporcionar el aducto bicíclico **19**.

---

En consonancia con resultados de estudios anteriores, Tufariello y cols. no observaron la formación del cicloaducto resultante de un cierre anular de 6 miembros debido a la preferencia de las nitronas a reaccionar en la posición  $\beta$  de los sistemas carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados.<sup>86</sup> El aducto *19* se transformó en el intermedio *20* después de dos pasos adicionales de reacción. La apertura del *N,O*-acetal y reducción del mesilato se completó en una única etapa de reacción usando hidruro de níquel generado a partir de las sales  $\text{NiCl}_2$  y  $\text{LiAlH}_4$ , para proporcionar *21*. La sal estable de ( $\pm$ )-anatoxina-a·HCl se obtuvo después de tres etapas de reacción.

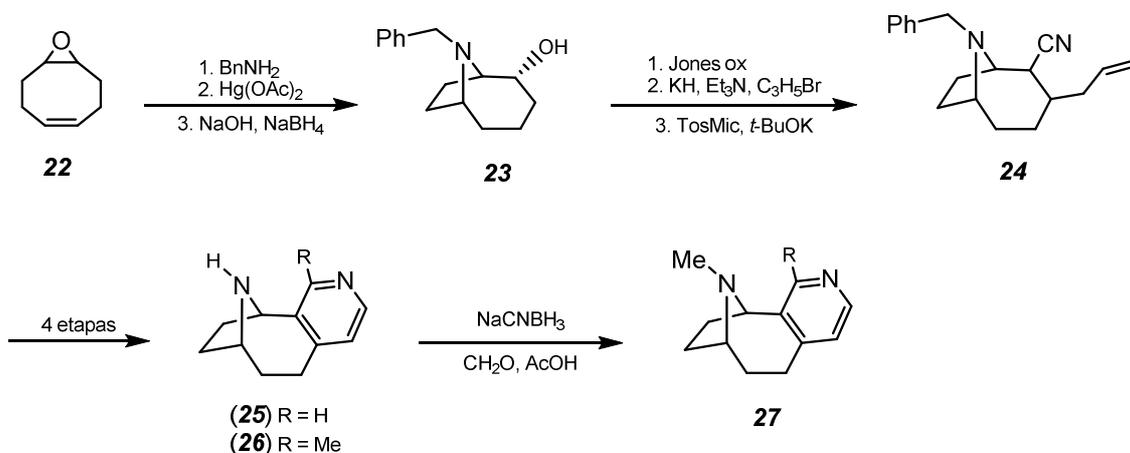
La ruta de síntesis de Tufariello proporcionó anatoxina-a racémica en nueve etapas químicas con un rendimiento global del 19% partiendo de *13*. La principal limitación de esta síntesis es la imposibilidad de obtener material ópticamente puro aplicando la ruta descrita.

#### 1.5.1.1.4 Preparación de análogos estructurales de anatoxina-a

Las estrategias para la obtención de análogos estructurales de anatoxina-a han respondido a la necesidad de encontrar agonistas altamente selectivos de los receptores nicotínicos neuronales (nAChRs) con propiedades farmacológicas equipotentes, pero no tóxicas.<sup>87,88</sup> Se ha documentado que la *N*-metilación de anatoxina-a reduce notablemente el efecto agonista de los nAChRs, razón por la cual la mayoría de las estrategias para la obtención de análogos estructurales de anatoxina-a se han dirigido al grupo enónico y no sobre el nitrógeno puente del biciclo.<sup>89,90</sup>

La primera síntesis para la preparación de análogos de anatoxina-a conformacionalmente restringidos fue reportada por Kanne y cols. a mediados de los años 80.<sup>91</sup> Con la intención de investigar cuál de los conformeros de anatoxina-a presentaba mayor afinidad por los nAChRs, prepararon una serie de piridilhomotropanos que portaran un grupo con un par de electrones dentro de la misma orientación espacial que el par de electrones de la enolcetona libre del conformero *s-cis* de anatoxina-a.

Tal como se recoge en el **esquema 1.4**, la síntesis comenzó por la apertura del anillo del epóxido comercial **22** con bencilamina (BnNH<sub>2</sub>).



**Esquema 1.4**

En etapas posteriores de mercurización-desmercurización se obtuvo el alcohol azabíclico **23**. Tres etapas de tratamiento consecutivas aportaron el nitrilo **24**. Los compuestos **25** y **26** fueron cada uno de ellos preparados en cuatro etapas a partir de **24**, mientras que un paso adicional de aminación reductiva convirtió a **25** en el derivado de anatoxina-a **27**.

De manera reseñable, Magnus y cols. presentaron algunas estrategias para funcionalizar C-11 en el grupo metílico de la cetona de la anatoxina-a.<sup>92</sup> Esas estrategias permitieron la incorporación de residuos de tioéteres conteniendo fluoróforos, aportando así nuevos ligandos para estudios estructurales sin comprometer la actividad biológica, debido a que se conserva la unidad acetilada (**Figura 1.7**).

La preparación de los diferentes derivados la realizaron a partir de la *N*-Boc anatoxina-a **31**. Para ello, exploraron diferentes vías de funcionalización de C-11 aprovechando que esta posición permite explorar tanto el perfil reactivo nucleofílico (vía formación del enolato) como electrofílico (*e.g.* vía una  $\alpha$ -halocetona). La formación del enol **32** por desprotonación directa del grupo metilo en C-11 de **31** y la metilación secuencial, les permitió obtener homoanatoxina-a con un rendimiento modesto que no superó el 40%. En este mismo sentido, el tratamiento del enolato **32** (M=K) con difenildisulfuro generó el  $\alpha$ -feniltio-derivado **28** (**esquema 1.5**).

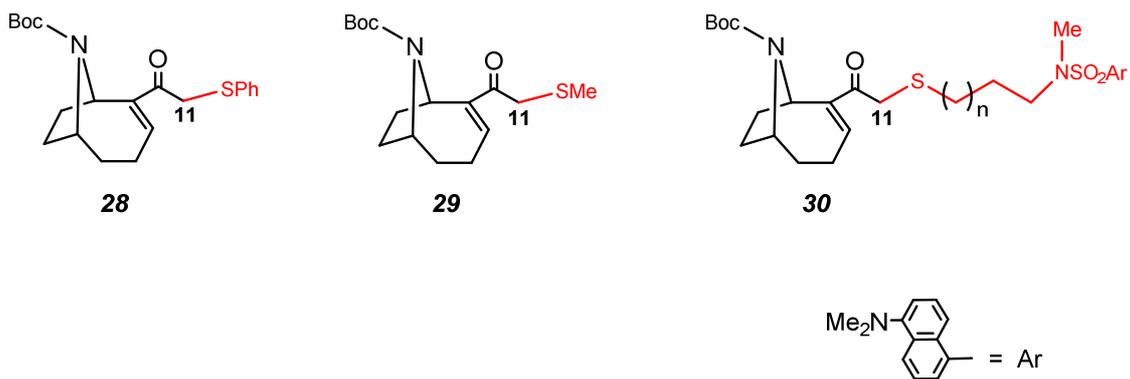
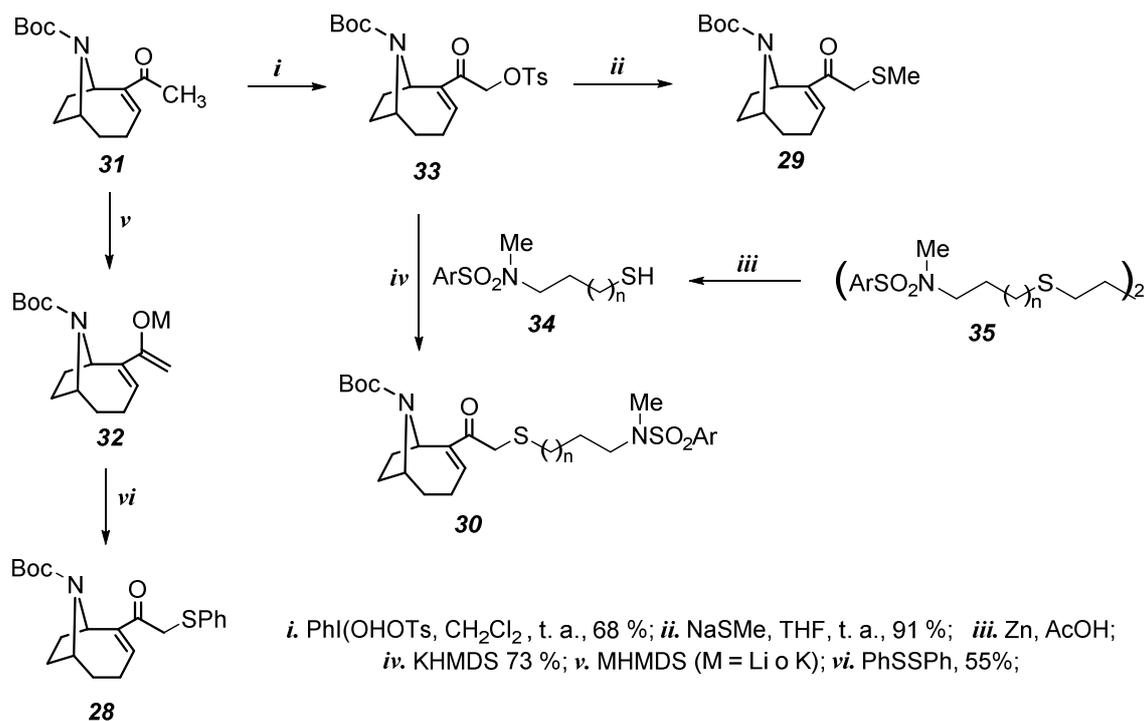


Figura 1.7. Análogos estructurales de anatoxina-a por modificación en C-11

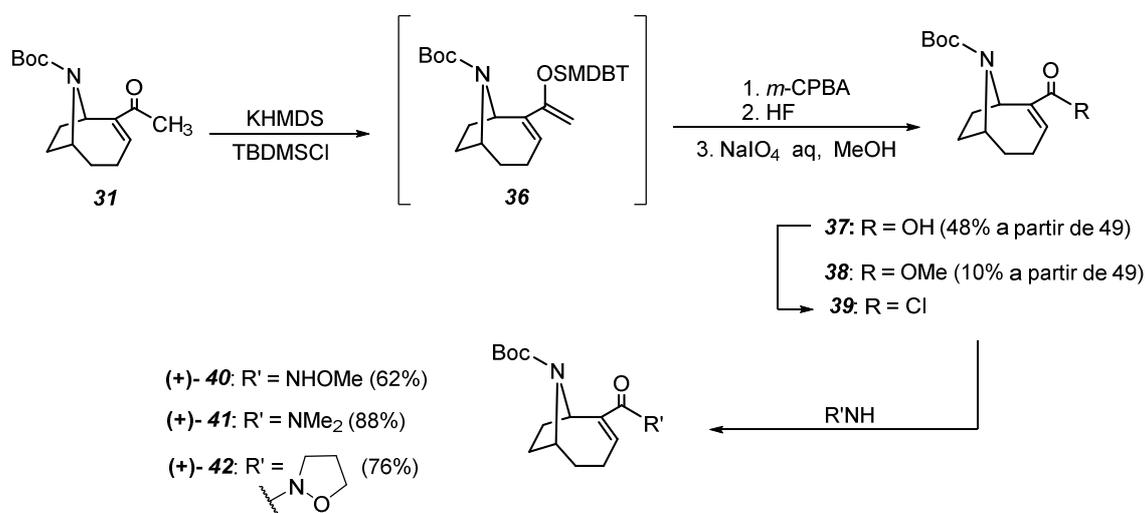
El mejor resultado de funcionalización lo obtuvieron por tratamiento de **31** con hidroxí(tosiloxi)iodobenceno (reactivo de Koser), que permitió obtener la  $\alpha$ -tosiloxicetona **33**; luego, el tratamiento de esta cetona con metanotiolato de sodio proporcionó el  $\alpha$ -tiometil-derivado **29**.



Esquema 1.5

En el mismo trabajo propusieron la obtención de derivados fluorescentes como **30**, que presentan brazos espaciadores metilénicos acoplados a través de una agrupación tioéter a C-11 de anatoxina-a, por el acoplamiento de **33** con unidades de dansilo **34** generadas de su precursor oxidado **35**.

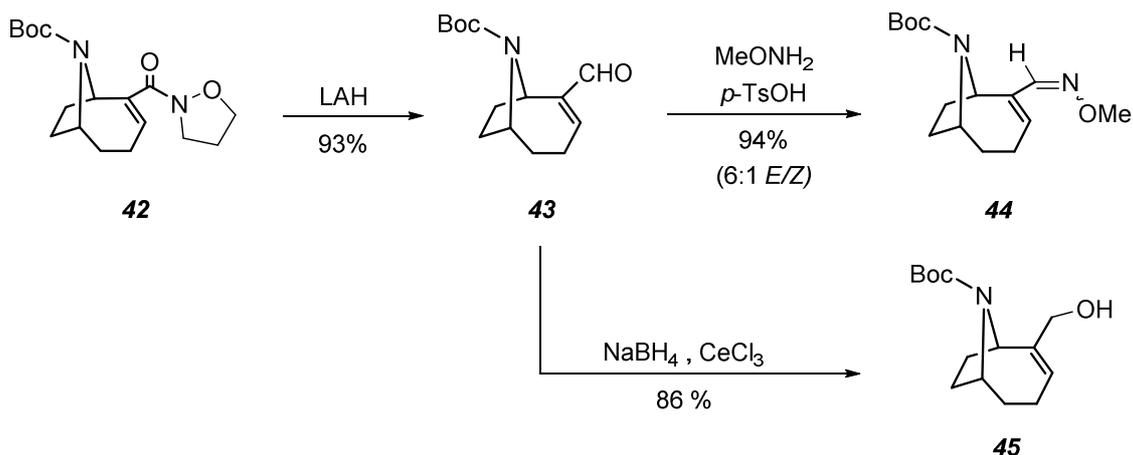
Sin embargo, los primeros trabajos relacionados con la modificación de la cadena lateral de anatoxina-a, al objeto de preparar derivados sin restricción conformacional en C-2 de la molécula, fueron desarrollados por el grupo de investigación de Rapoport.<sup>93</sup> Partiendo del enantiómero natural de *N*-Boc anatoxina-a **31**, prepararon una serie de amidas laterales como se describe en el **esquema 1.6**. El procedimiento de síntesis comenzó con la conversión de **31** en el ácido carboxílico **37** en cuatro etapas consecutivas de reacción, en donde también observaron la formación de pequeñas cantidades del éster **38**.



Esquema 1.6

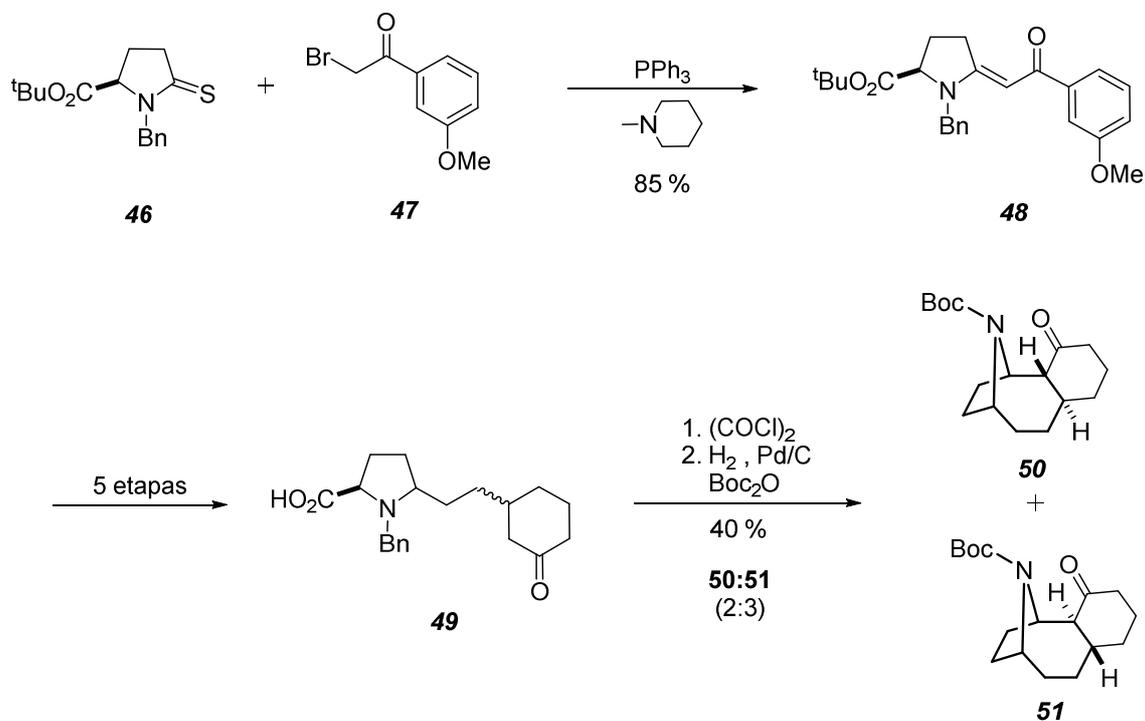
A partir del compuesto **37** se formó el correspondiente cloruro de ácido **39**, que inmediatamente se usó para preparar las amidas **40-42**. Posteriormente, la amida **42** fue reducida al aldehído **43** y condensada con *O*-metilhidroxilamina (H<sub>2</sub>NOMe) para producir la oxima **44** (**esquema 1.7**). Alternativamente, **43** se redujo bajo condiciones de Luche para proporcionar el alcohol alílico **45** (anatoxinol).

El mismo grupo también reportó una serie de análogos de anatoxina-a con anillos fusionados con la intención de bloquear la configuración de la agrupación enónica *s-trans* e identificar el papel conformacional de estos derivados respecto a su bioactividad.



Esquema 1.7

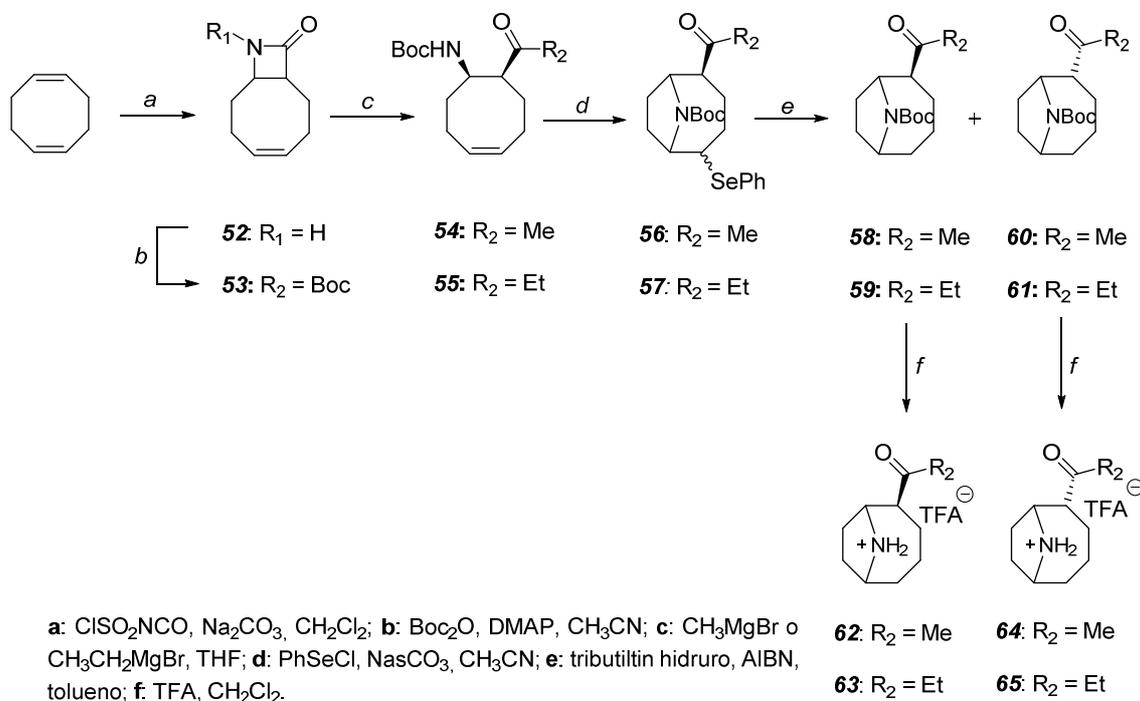
Ejemplo de este tipo de análogos, los compuestos *50* y *51* del **esquema 1.8**, se prepararon por alquilación de la tiolactama *46* con *47*. A continuación, una reacción de contracción de sulfuro de Eschenmoser proporcionó la amida vinílica *48*, a partir de la cual se llegó a la mezcla diastereomérica de cetoácidos *49*. Finalmente, la descarboxilación de la mezcla anterior les condujo a la obtención de los azabicclos fusionados vía ciclación ácida de la sal de iminio intermedia; luego, la desbencilación y re-protección de las aminas libres como los correspondientes *Boc*-carbamatos proporcionaron los compuestos *50* y *51*.



Esquema 1.8

En los últimos tres años, los productos de degradación tanto de anatoxina-a como de homoanatoxina-a han acaparado la atención por su significación analítica; es decir, si bien estos productos no representan un riesgo para la salud, su presencia en un lecho hidrológico permite suponer la existencia de las biotoxinas precursoras. En este sentido, Mann y cols.,<sup>94</sup> basados en la química descrita por Parsons y cols.<sup>80</sup> para la síntesis racémica de anatoxina-a, propusieron una modificación de esa ruta sintética con la finalidad de obtener los metabolitos dihidro-derivados de anatoxina-a y homoanatoxina-a para su uso como estándares analíticos en LC-MS/MS. Adicionalmente, establecieron la configuración relativa *cis-trans* de los productos obtenidos.

La síntesis descrita en el **esquema 1.9** involucra la apertura de la lactama **53** empleando los reactivos de Grignard correspondientes. A continuación, las aminas liberadas **54** y **55** se sometieron a un proceso de ciclación intramolecular asistida por cloruro de fenilselenio; de manera secuencial, la deselenización reductiva de los productos de ciclación condujeron a la obtención de los productos dihidro-derivados **58-61**, respectivamente.



Esquema 1.9

---

La etapa de reducción del enlace C–Se se realizó directamente empleando hidruro de tributiltin a reflujo de tolueno empleando cantidades catalíticas de ALBN (azobisisobutironitrilo), un proceso que significó una mejora de la ruta de síntesis con respecto a la secuencia de oxidación-eliminación-hidrogenación descrita originalmente. Finalmente, tomando la precaución de no aplicar tiempos prolongados para la desprotección de la amina puente y evitar así la formación de epímeros en C–2, se obtuvieron los productos dihidro-derivados 62-65 de estas neurotoxinas.

### 1.5.2 Preparación de conjugados proteicos

Las proteínas que con mayor frecuencia se utilizan para la conjugación covalente de los haptenos son las albúminas [BSA (seroalbúmina bovina), OVA (ovoalbúmina), CONA (conalbúmina) y HSA (seroalbúmina humana)] y las hemocianinas [KLH (hemocianina de la lapa<sup>iv</sup>), HCH (hemocianina del cangrejo herradura<sup>v</sup>), CCH (hemocianina del chanque o loco<sup>vi</sup>)]. Los criterios de selección de una proteína u otra se basan en su inmunogenicidad, solubilidad, facilidad de conjugación y preferencias personales.

Algunas de las características más destacables por las que la BSA es la proteína más utilizada son: elevada inmunogenicidad, tolerancia a cargas hapténicas altas sin pérdida de solubilidad, elevada estabilidad física y química, disponibilidad y bajo coste. Además, con esta proteína se facilita la determinación del número de moléculas acopladas, y presenta, adicionalmente, amplia tolerancia a diferentes disolventes orgánicos, en los cuales normalmente son solubles los haptenos, tales como piridina, DMSO y DMF.

Por otra parte, es práctica habitual preparar los conjugados que se emplean como inmunorreactivos en los inmunoensayos con proteínas diferentes a las utilizadas en la inmunización, con el objetivo de garantizar que los anticuerpos seleccionados no muestren reconocimiento hacia la proteína.<sup>95,96</sup>

Será la naturaleza del grupo funcional que contenga el brazo espaciador la que condicionará la química específica que permitirá realizar el acoplamiento covalente.

---

<sup>iv</sup> *Megathura crenulata*

<sup>v</sup> *Limulus polyphemus*

<sup>vi</sup> *Concholepas concholepas*

Probablemente lo más habitual es partir de haptenos que poseen un grupo carboxilo terminal, y generar un enlace amida con los grupos amino libres de la proteína, como se indicó anteriormente. Para poder efectuar esta reacción en condiciones suaves, que no afecten a la integridad estructural de la proteína, se precisa previamente activar el carboxilato del hapteno.<sup>97</sup>

Los procedimientos más empleados con esta finalidad son el método del éster activo y el del anhídrido mixto.<sup>98</sup> Una vez activado el grupo carboxilato, se hace reaccionar el hapteno con la proteína en medio ligeramente básico, de modo que los grupos amino de la proteína se encuentren desprotonados y se facilite el acoplamiento con el carbonilo de la especie química activada.

La verificación y cuantificación de la conjugación del hapteno a la proteína, es decir, el número de moléculas de hapteno unidas por molécula de proteína, o relación molar (RM), se puede realizar mediante espectroscopía UV si el hapteno absorbe suficientemente en esta zona del espectro. Previa determinación de los coeficientes de extinción molar, tanto del hapteno como de la proteína a varias longitudes de onda, es posible realizar una estimación de la RM del conjugado proteína-hapteno.

Los avances en técnicas de espectrometría de masas, como MALDI-TOF, han permitido determinar con excelente precisión diferencias de masa muy pequeñas en las proteínas habitualmente utilizadas para la conjugación, lo que ofrece la oportunidad de determinar la densidad de hapteno por unidad proteica.<sup>99,100</sup> Esta técnica es especialmente útil cuando los haptenos no presentan un espectro UV relevante, como ocurre con la anatoxina-a.

En cuanto a la RM óptima para inducir una adecuada respuesta inmune, cabe decir que no existe consenso al respecto; se han obtenido buenos resultados tanto con relaciones molares bajas como altas. Ello podría depender de la proteína utilizada, de la naturaleza del hapteno y/o del protocolo de inmunización aplicado; si bien para el caso de la BSA relaciones molares entre 1:10 y 1:20 (proteína:hapteno) se aceptan como adecuadas.

### 1.5.3 Producción de anticuerpos

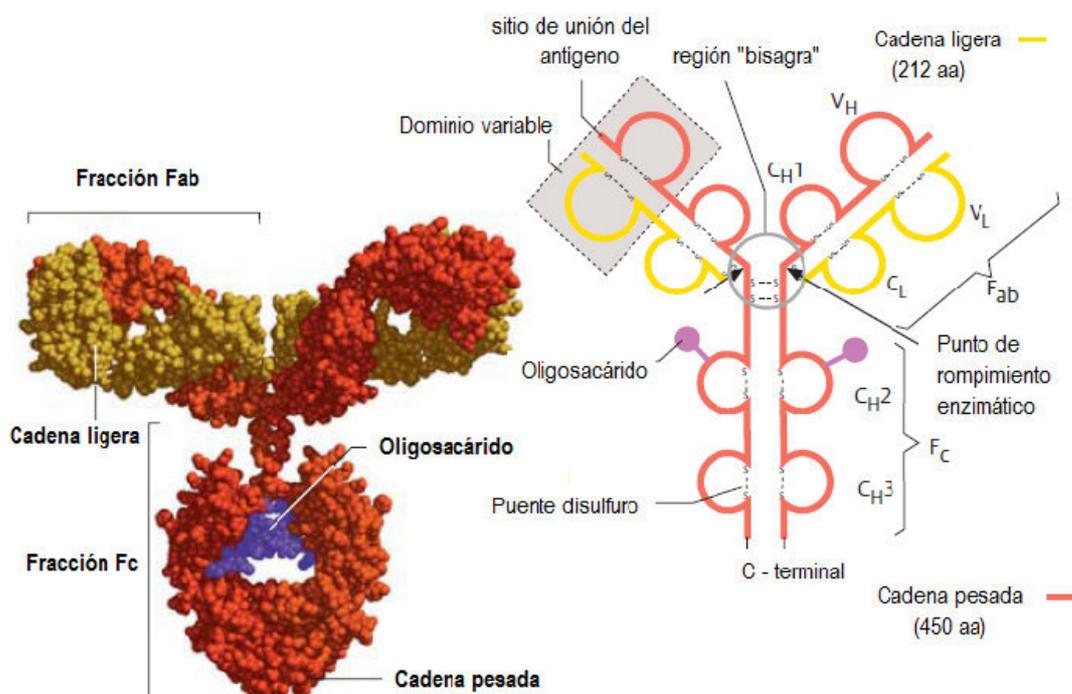
Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs), son glicoproteínas bifuncionales que pertenecen al grupo de gamma-globulinas producidas por los linfocitos B, normalmente con ayuda de las células T, como parte de la respuesta del sistema inmunitario ante la presencia de moléculas o agentes extraños (antígenos) en el organismo, con la característica sobresaliente de poderse unir a éstos con elevada afinidad y especificidad.

Debido a su carácter adaptativo, el sistema inmune de los vertebrados es capaz de poner en marcha mecanismos de neutralización específica de tales sustancias, así como de generar células de memoria productoras de anticuerpos dirigidos selectivamente hacia cada antígeno, que se activarán posteriormente ante una nueva exposición, dando lugar a una respuesta de defensa más eficaz.

La estructura de las inmunoglobulinas resulta ser característica por presentar una forma parecida a la letra Y. En la **Figura 1.8** se presenta de forma esquemática la estructura típica de un anticuerpo, en particular de una inmunoglobulina de tipo G, así como un modelo tridimensional. La estructura básica de un anticuerpo está formada por dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (de 50 kDa cada una) y dos cadenas polipeptídicas ligeras (de 25 kDa cada una) también idénticas. Las cadenas pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro, y cada una, a su vez, se une a una cadena ligera, también a través de puentes disulfuro. Además, las dos cadenas pesadas están asociadas a polisacáridos.

En los anticuerpos se pueden distinguir tres dominios bien diferenciados. Por una parte, dos fragmentos Fab (*fragment antigen binding*) que son idénticos y forman los brazos de la Y. Los Fab están formados por la región N-terminal de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras. Cada uno de los Fab contiene a su vez una zona variable que constituye el paratopo o sitio de unión del antígeno, por lo que los anticuerpos son moléculas bifuncionales. El tercer dominio se denomina Fc (*Fragment crystallizable*), constituye la base de la Y y se corresponde con la región C-terminal de las cadenas pesadas. Esta fracción posee una secuencia de

aminoácidos constante, contiene sitios de glicosilación, y desempeña un papel importante durante la activación de la respuesta inmune.



**Figura 1.8.** Representación esquemática de una inmunoglobulina tipo IgG (imagen adaptada de [www.visualscience.ru](http://www.visualscience.ru))

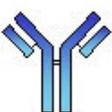
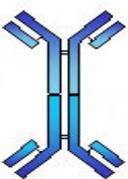
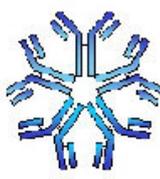
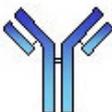
La mayor parte de la estructura del anticuerpo es constante y sólo los extremos de los fragmentos Fab presentan regiones variables ( $V_L$  y  $V_H$ ). Es en esta zona donde se produce la interacción con el antígeno, por lo que constituye la porción más pequeña del anticuerpo necesaria para su actividad, y proporciona un grado excepcional de versatilidad.

Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases o isotipos, en función de su estructura (diferentes tipos de cadena pesada:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , distinta composición de aminoácidos, carga y tamaño), actividad funcional, momento de la respuesta en la que aparecen y lugar donde se encuentran (suero, leche, saliva, etc.): IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las cadenas ligeras pueden a su vez ser de tipo  $\kappa$  o  $\lambda$ , aunque es únicamente el tipo de cadena pesada la que determina la subclase a la que pertenece cada anticuerpo. Las subclases de anticuerpos difieren en el número de puentes disulfuro y en la longitud de la región "bisagra". Además, el número de

regiones Fab determina el número de paratopos con el que el anticuerpo puede unirse al antígeno (**tabla 1.2**).

Se estima que el 75-80% de las inmunoglobulinas totales en el suero sanguíneo son del tipo IgG; además, son las únicas presentes en respuestas inmunes secundarias, con afinidad y especificidad madurada hacia el antígeno. Es por ello que son el isotipo más frecuente de los anticuerpos que se generan.

**Tabla 1.2.** Clases de anticuerpos y número de paratopos

	Clases de anticuerpos				
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Cadena pesada	γ	α	μ	δ	ε
Cadena ligera	K o λ	K o λ	K o λ	K o λ	K o λ
Estructura					

### 1.5.3.1 Inmunización y tipos de anticuerpos

El paso inmediato para la obtención de anticuerpos es iniciar un proceso de inmunización de animales de experimentación con el conjugado proteico del hapteno. La inmunización es en su mayor parte un proceso empírico, y la respuesta inducida depende del inmunógeno, de la especie inmunizada, y de la vía y pauta de la inmunización.

En términos generales, un inmunoensayo puede estar basado en el uso de anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes. Los anticuerpos policlonales (pAb) se obtienen directamente del suero sanguíneo de los animales inmunizados, razón por la que también se les conoce como antiseros (As); en principio, estos antiseros representan la respuesta inmune global procedente de múltiples líneas celulares, por lo que están compuestos por una mezcla heterogénea de anticuerpos con propiedades de unión al antígeno muy diferentes.

Por su parte, los anticuerpos monoclonales (mAb) provienen de una única línea celular productora de anticuerpos o clon, seleccionada y estabilizada *in vitro*, por lo que se trata de un reactivo homogéneo y potencialmente ilimitado. Estas líneas celulares se obtienen generalmente a partir de ratones inmunizados y aplicando la tecnología de generación de hibridomas,<sup>101</sup> procedimiento que se detalla en el siguiente apartado.

Los anticuerpos recombinantes (rAb) se obtienen mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, a través de las cuales es posible aislar los genes codificantes de las inmunoglobulinas para ser clonados y expresados en diferentes sistemas biológicos. La técnica de presentación de anticuerpos en la superficie de fagos (*phage display*) ha tenido gran repercusión en los últimos años por su capacidad para crear genotecas de anticuerpos recombinantes (scFv, fragmento variable de cadena única, y Fab), ya que al permitir la asociación genotipo-fenotipo, resulta una plataforma muy útil para la producción y selección de anticuerpos con propiedades muy concretas.<sup>102,103,104</sup>

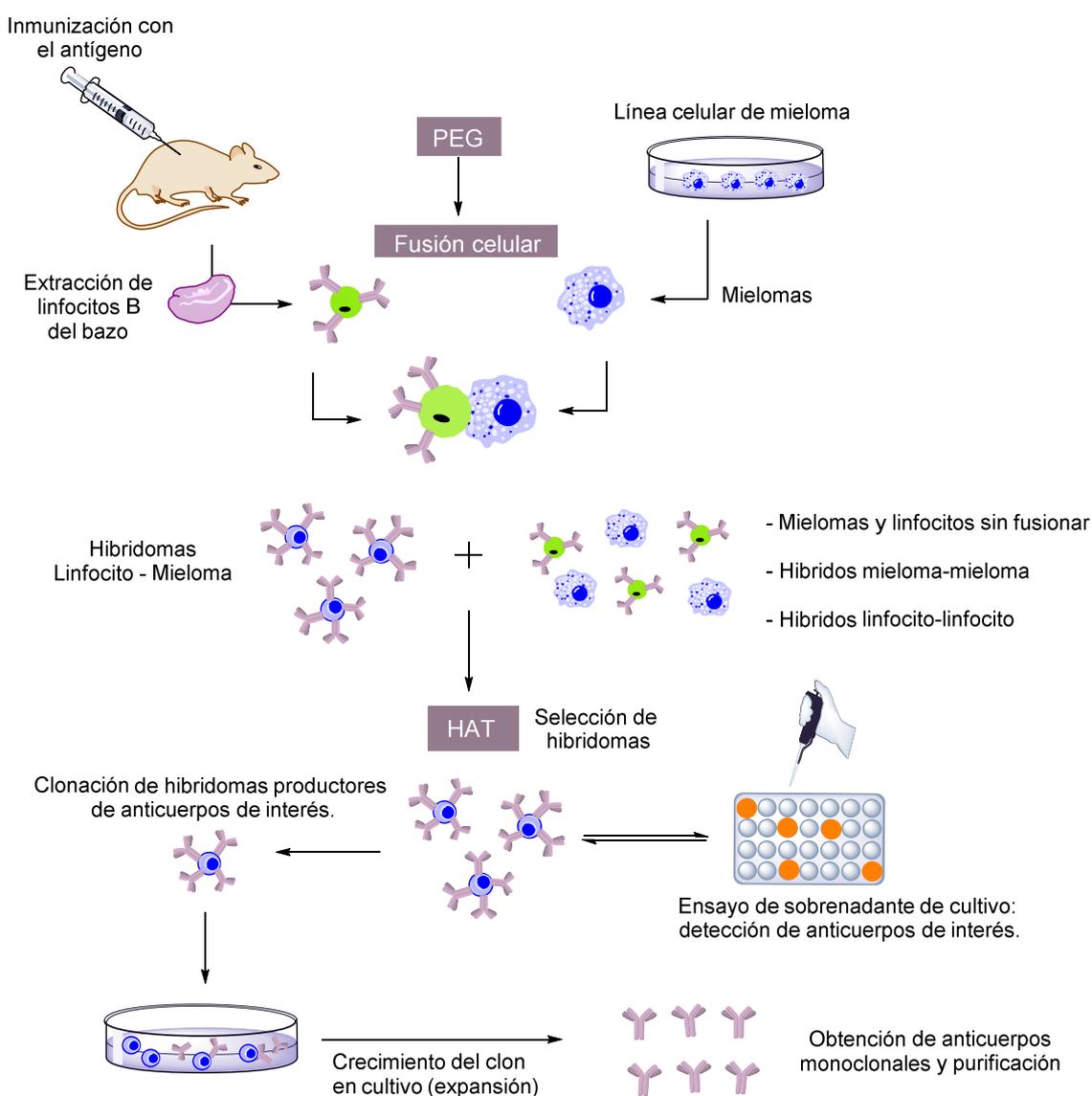
En el caso de los pAbs, su obtención resulta sencilla, rápida (3-4 meses) y económica. Sin embargo, se trata de un reactivo limitado con elevada variabilidad entre individuos, por lo que cada suero posee características concretas difíciles de reproducir. La producción de mAbs es más compleja y laboriosa (6-8 meses), y supone un mayor coste. Sin embargo, la tecnología de generación de hibridomas ofrece la posibilidad de seleccionar células productoras de anticuerpos con propiedades establecidas de antemano. Además, una vez estabilizado el clon productor, se dispone de una fuente ilimitada y homogénea de reactivo. Los rAbs por su parte permiten reducir el uso de animales, y posibilitan la modulación de características del anticuerpo como la afinidad, selectividad y/o solubilidad en diversos medios empleando estrategias basadas en la mutagénesis de las secuencias codificantes.<sup>105</sup>

### **1.5.3.2 Tecnología de generación de hibridomas**

La producción de anticuerpos aplicando la tecnología para la generación de hibridomas fue descrita por Georges Köhler y César Milstein en 1975, quienes

---

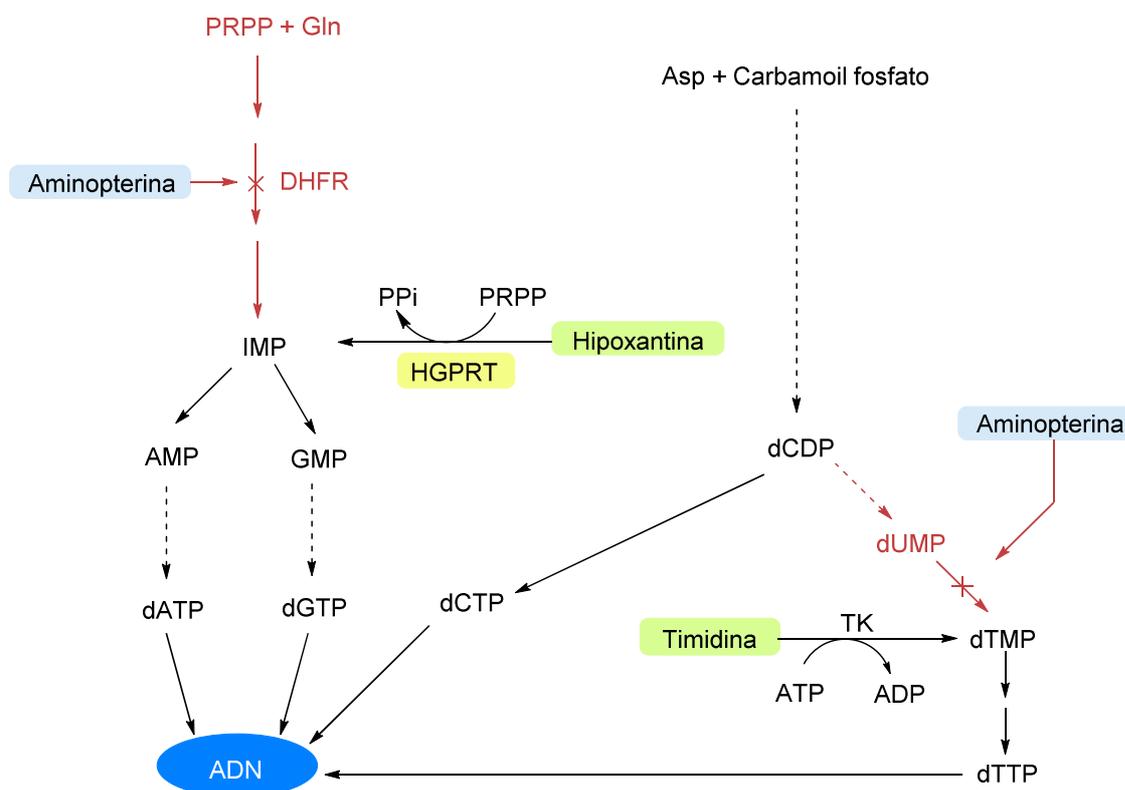
mediante la fusión de células de una línea tumoral de mieloma con linfocitos B extraídos del bazo de un ratón inmunizado, consiguieron la formación de una población híbrida o hibridoma capaz de crecer *in vitro* indefinidamente y producir anticuerpos. La selección posterior de un único hibridoma con unas características determinadas a partir de una mezcla heterogénea y su consiguiente expansión, permite disponer de un clon de células idénticas productoras del mismo anticuerpo (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Representación esquemática de la producción de mAbs aplicando tecnología de generación de hibridomas

La principal limitación de la producción de hibridomas radica en que la fusión de los linfocitos con los mielomas se realiza al azar. La consecuencia de este hecho

es que la población celular obtenida es muy heterogénea, ya que se compone de linfocitos sin fusionar, híbridos linfocito-linfocito, híbridos mieloma-mieloma y de hibridomas propiamente dichos. Ahora bien, dado que solamente interesan estos últimos, es necesario eliminar selectivamente a los demás tipos celulares, lo que se consigue con la utilización de aminopterina a través de un proceso que se puede explicar de la siguiente manera: en las células animales existen dos posibles rutas para la síntesis de nucleótidos de purina, una ruta natural y una ruta alternativa (**Figura 1.10**); la aminopterina bloquea selectivamente la primera ruta al inhibir a la dihidrofolato reductasa (DHFR), una de las enzimas que participan en la ruta metabólica natural de síntesis de las bases nitrogenadas púricas y pirimídicas de los ácidos nucleicos, lo que origina la activación de la ruta alternativa.



**Figura 1.10.** Rutas metabólicas para la síntesis de nucleótidos donde se indican los puntos de inhibición por la droga aminopterina

Por otro lado, la línea tumoral empleada, además de estar modificada genéticamente para no producir anticuerpos, presenta una mutación en el gen que codifica para la enzima HGPR (hipoxantina guanina fosforribosil tranferasa) que

participa en la vía alternativa de la síntesis de purinas (adenina y guanina). Por el contrario, los linfocitos B sí que presentan esta enzima (son HGPRT<sup>+</sup>).

Utilizando como medio post-fusión el denominado HAT, que contiene aminopterina, hipoxantina y timidina como precursores de la síntesis de purinas, sólo los hibridomas, al provenir de un linfocito HGPRT<sup>+</sup>, pueden emplear la vía alternativa para sintetizar las purinas y por ello sobreviven. No obstante, como consecuencia del uso de aminopterina, también se bloquea la ruta natural para la síntesis de nucleótidos de timina, motivo por el cual el medio post-fusión (HAT) también contiene timidina para que así las células puedan usar la ruta alternativa. En cambio, los mielomas y los híbridos mieloma-mieloma mueren al no poder emplear ninguna de las dos rutas, ya que no disponen de nucleótidos con bases púricas para la replicación del ADN.

Al cabo de 10-12 días de haberse realizado la fusión celular, tiempo suficiente para que se haya producido la selección química, los sobrenadantes de cultivo son analizados para determinar su capacidad para producir anticuerpos específicos hacia el analito problema. Mediante procedimientos como el ELISA diferencial,<sup>106</sup> es posible identificar aquellos hibridomas que producen anticuerpos que reconocen tanto al conjugado de ensayo competidor como a la molécula diana en su forma libre.

Una vez asegurado el carácter monoclonal del hibridoma mediante sucesivos procesos de clonación celular, se procede a su expansión, cultivándolos cada vez en recipientes de mayor tamaño. Cuando ya se dispone de suficiente cantidad de células, la línea de hibridoma seleccionada se conserva en nitrógeno líquido (criopreservación). Los hibridomas suelen producir anticuerpos a una concentración comprendida entre 30 y 100 µg/mL, por lo que es posible obtener sin dificultad entre 5 y 10 mg de mAb a partir de un volumen de sobrenadante comprendido entre 100 y 200 mL.

### 1.5.4 Caracterización de anticuerpos

La caracterización de los anticuerpos tras su purificación, habitualmente por cromatografía de inmovilizada afinidad, se realiza en términos de afinidad y especificidad para determinar cuál o cuáles son los más adecuados para el desarrollo definitivo de un método inmunoquímico aplicable a la detección del analito de interés. La afinidad de un anticuerpo se define como la suma de todas las fuerzas repulsivas y atractivas (enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y/o hidrofóbicas) que se producen entre el sitio de unión del anticuerpo (paratopo) y el correspondiente determinante antigénico (epitopo). Normalmente se expresa como constante de afinidad ( $K_a$ ). La especificidad es la capacidad de un anticuerpo de distinguir entre varios antígenos (o analitos) de estructuras similares. Se determina mediante estudios de reactividad cruzada (RC) con otros antígenos de estructura química parecida al analito de interés.

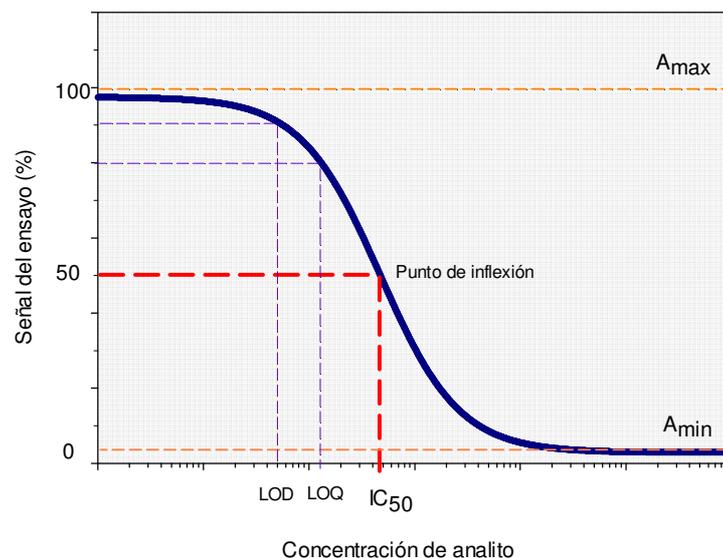
El análisis de proteínas y microorganismos a través de un inmunoensayo puede realizarse mediante ensayos tipo sandwich, ya que debido a su gran tamaño poseen varios epitopos que le permiten la unión a varios anticuerpos simultáneamente. Sin embargo, en el caso de compuestos de bajo peso molecular, no es posible sin aproximaciones moleculares desarrollar inmunoensayos de este tipo, dado que los haptenos constituyen un único epitopo y no pueden unirse simultáneamente a dos anticuerpos, por lo que la detección debe realizarse mediante un ensayo competitivo.<sup>107</sup> Un ensayo competitivo puede ser descrito por la siguiente reacción inmunoquímica:



En este tipo de ensayo, el analito compite con un hapteno marcado (\*) (conjugado de ensayo) por los sitios de unión del anticuerpo, el cual debe encontrarse en concentración limitante para que la competición sea eficaz. Esta naturaleza competitiva del ensayo hace que la señal obtenida sea inversamente proporcional a la concentración de analito. Por tanto, cuanto más analito libre se encuentre en la muestra, más anticuerpo se unirá al mismo y menos al hapteno

marcado, por lo que se generará menos señal; por el contrario, en ausencia de analito se generará la máxima señal posible del ensayo.

La representación en escala semilogarítmica de la señal frente a la concentración de analito da lugar a una curva decreciente de tipo sigmoide (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Curva de inhibición típica de un inmunoensayo de tipo competitivo

Generalmente, se toma el valor de concentración de analito en el punto de inflexión de la curva como una estimación de la sensibilidad del ensayo, siendo ésta tanto mayor cuanto menor sea el valor de dicha concentración. Tradicionalmente este valor se denomina IC<sub>50</sub> ya que coincide con la concentración que proporciona una inhibición de la A<sub>max</sub> del 50%, si el valor de la señal mínima se acerca a cero; también suele emplearse, en condiciones limitantes, como estimación de la K<sub>a</sub> del anticuerpo hacia el analito.

#### 1.5.4.1 Formatos de ELISA competitivo

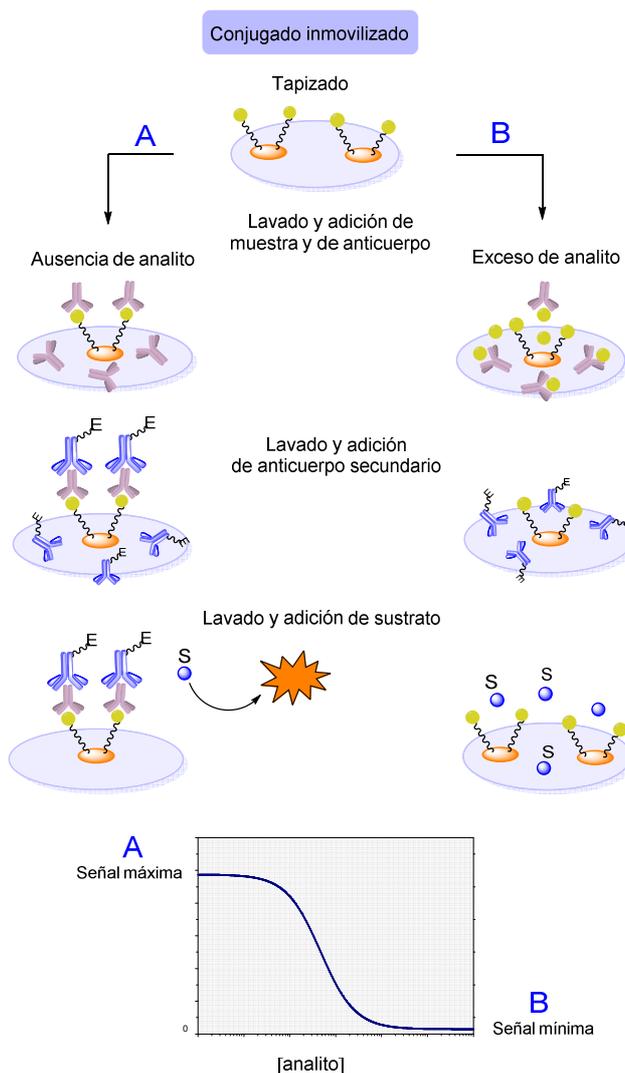
Como ya se ha comentado, en un ensayo tipo ELISA uno de los reactivos debe estar inmovilizado sobre un soporte mientras otro debe estar marcado con una enzima. Las enzimas más comunes son la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP). El tipo de señal producida depende del sustrato empleado. En el caso de la HRP, la detección colorimétrica de la actividad se realiza mediante

la oxidación de una serie de sustratos, tales como OPD (o-fenilendiamina), TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) o ABTS (ácido 2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). La OPD es un sustrato incoloro que al ser oxidado por la peroxidasa utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como aceptor de electrones da lugar a un compuesto de color anaranjado (una diimina que muestra un máximo de absorción a 492 nm en medio ácido). Otros sustratos de la enzima que proporcionan diferentes tipos de detección son el luminol como sustrato quimioluminiscente<sup>108</sup> y el ácido homovalínico (HVA), el 3-*p*-hidroxifenilacético o la proclorperacina (PCP) como sustratos fluorogénicos.<sup>109</sup>

Un ELISA competitivo puede adoptar diferentes formatos según cuál sea la especie inmunorreactiva anclada sobre el soporte sólido,<sup>110,111</sup> el formato indirecto y el formato directo, que se exponen brevemente a continuación.

#### **1.5.4.1.1 Formato indirecto o de conjugado inmovilizado**

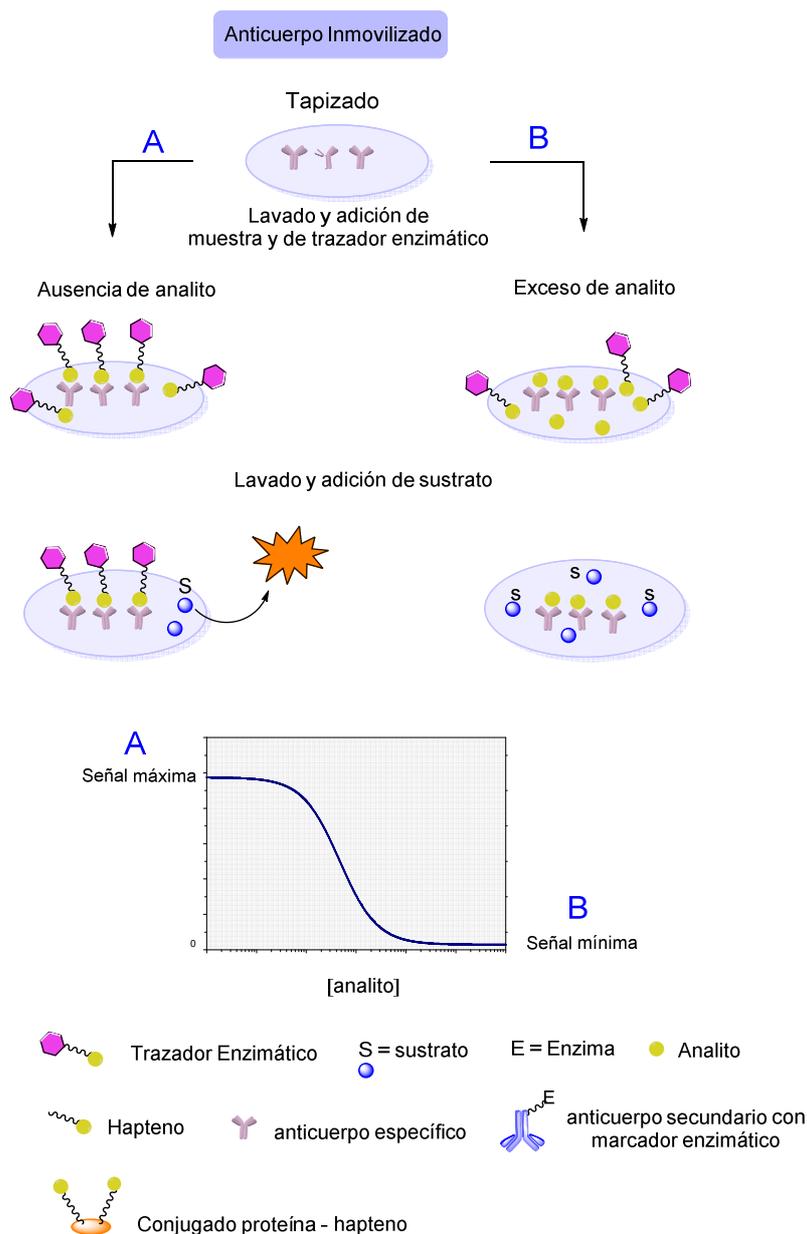
En este caso el reactivo inmovilizado es un conjugado proteína-hapteno, habitualmente anclado a la placa mediante adsorción pasiva, etapa que se conoce como tapizado (**Figura 1.12**). En la etapa competitiva se adicionan al pocillo una cantidad limitante del anticuerpo específico (anticuerpo primario) y el analito, de manera que se establece un equilibrio en el que el conjugado inmovilizado y el analito en disolución compiten por unirse al anticuerpo. Cuanto más analito libre haya en disolución, menos anticuerpo se unirá al conjugado inmovilizado y viceversa. Después de una etapa de lavado, se adiciona un anti-anticuerpo (anticuerpo secundario) marcado enzimáticamente que se unirá al anticuerpo primario que haya permanecido unido al conjugado de tapizado. El anticuerpo secundario permite obtener la señal al añadir el sustrato enzimático correspondiente.



**Figura 1.12.** Representación esquemática del desarrollo de un ensayo ELISA en formato indirecto (conjugado inmobilizado)

#### 1.5.4.1.2 Formato directo o de anticuerpo inmobilizado

En este formato y como se ilustra en la **Figura 1.13**, el hapteno se acopla covalentemente a una enzima (trazador enzimático), y es el anticuerpo específico el que se inmoviliza sobre la placa. El anticuerpo puede ser absorbido bien de manera directa (adsorción pasiva) o bien de manera indirecta, por ejemplo, mediante el empleo de un anticuerpo de captura o proteínas G o A. Esta última estrategia puede resultar interesante para conseguir revertir posibles modificaciones en el funcionamiento del anticuerpo como consecuencia de su inmovilización directa sobre el soporte de poliestireno.<sup>112,113</sup>



**Figura 1.13.** Representación esquemática del desarrollo de un ensayo ELISA directo (anticuerpo inmovilizado)

En este formato, en la etapa competitiva se añade al pocillo el analito y el trazador enzimático. Analito y trazador compiten por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado; en función de la concentración de analito libre presente en la muestra, quedará finalmente una determinada cantidad de conjugado enzimático unida al anticuerpo. En este caso ya no se requiere de un segundo reactivo para generar la señal, puesto que el propio trazador enzimático permitirá obtenerla tras la adición del sustrato adecuado.

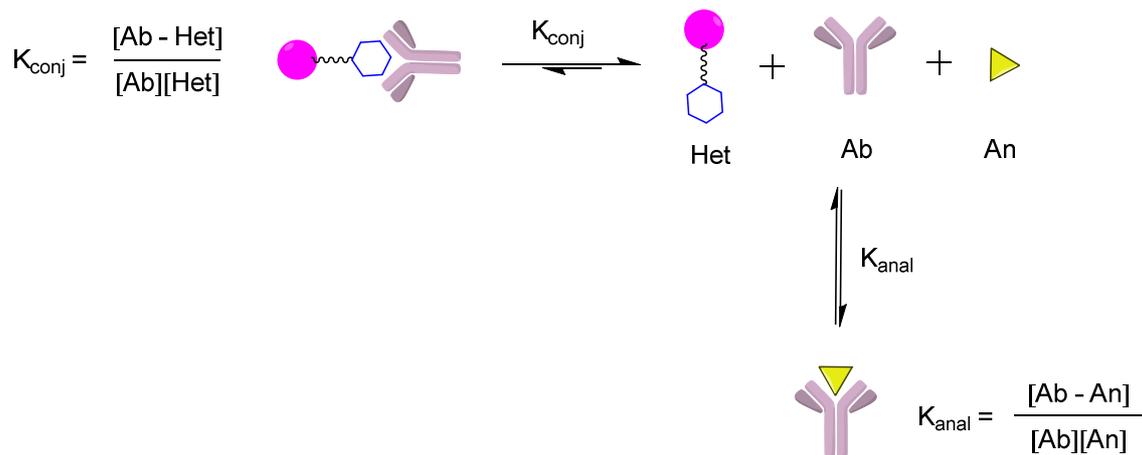
---

### 1.5.4.2 Optimización de la sensibilidad del ensayo

En base al equilibrio dinámico establecido entre el anticuerpo, el analito libre y la especie competidora, la sensibilidad del ensayo (estimada a partir del valor de  $IC_{50}$  de la curva de inhibición) dependerá de la constante de afinidad del anticuerpo hacia ambos reactivos. Por lo tanto, sería en principio posible alterar el equilibrio de la reacción para aumentar la afinidad aparente del anticuerpo hacia el analito libre, es decir, aumentar la sensibilidad al forzar el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo anticuerpo-analito, a través de la modificación de algunos de los parámetros característicos de un inmunoensayo.<sup>114</sup> Sin embargo, el recurso que más posibilidades ofrece para mejorar el ensayo es sin duda la heterología.

El concepto de heterología viene determinado por la naturaleza del hapteno competidor que interviene en el inmunoensayo. Así, se define como ensayo homólogo a aquel que utiliza un conjugado (formato indirecto) o trazador enzimático (formato directo) homólogo, esto es, un conjugado constituido por el mismo hapteno que el que se utilizó en la inmunización. Por el contrario, un ensayo heterólogo es aquel en el que el hapteno utilizado en la preparación de los conjugados competidores es estructuralmente distinto del hapteno inmunizante. De esta forma, a través del uso de un competidor heterólogo para el cual el anticuerpo presenta una afinidad ligeramente menor de la que tiene por el conjugado homólogo, se consigue desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo anticuerpo-analito, es decir, aumentar la afinidad aparente del anticuerpo hacia el analito libre, lo que se traduce en una mejora de la sensibilidad de ensayo (**Figura 1.14**).<sup>115,116</sup>

En principio, cuanto más diferente sea el hapteno competidor, menor será la afinidad del anticuerpo hacia él y más sensible puede ser el ensayo. Sin embargo, si dicha afinidad fuese excesivamente baja, el conjugado podría no ser reconocido, por lo que no se obtendría señal y, por tanto, no existiría ensayo. Dado que, al igual que ocurre con el hapteno inmunizante, predecir la estructura ideal del hapteno competidor no es sencillo, es recomendable explorar diversas aproximaciones sintéticas que permitan obtener haptenos heterólogos.



**Figura 1.14.** Modificación del equilibrio de reconocimiento de un anticuerpo (Ab) hacia un analito (An) en la etapa de competición de un ELISA competitivo al realizar el ensayo con un conjugado heterólogo (Het)



## 2. OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro de la línea de investigación denominada “Síntesis de moléculas con aplicaciones biotecnológicas y analíticas”, adscrita al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia, y de la línea de investigación “Inmunotecnología analítica de alimentos”, adscrita al Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Dentro de estas líneas de investigación, el propósito principal de esta Tesis Doctoral es la síntesis de haptenos y bioconjugados de anatoxina-a para el desarrollo de métodos inmunoquímicos para esta biotoxina.

Este estudio, a tenor del objetivo indicado, pretende obtener como resultado más destacable anticuerpos monoclonales de elevada afinidad y especificidad hacia anatoxina-a como inmunorreactivos clave para el desarrollo de un método analítico. Para ello, será necesario conseguir una serie de objetivos particulares que se enumeran a continuación:

1. Obtener por síntesis química una colección de análogos estructurales funcionalizados de anatoxina-a (haptenos) que incorporen un brazo espaciador por diferentes posiciones de la molécula de interés, manteniendo la integridad estructural de la misma al objeto de asegurarla mejor exposición del analito al sistema inmune del animal inmunizado. Dentro de este contexto sintético, adicionalmente se pretende:
  - 1.1. Sintetizar un hapteno para anatoxina-a derivatizada como estrategia alternativa para la obtención de anticuerpos analíticamente útiles para esta cianotoxina.
  - 1.2. Obtener por síntesis química ( $\pm$ )-anatoxina-a y lograr la purificación cromatográfica de los dos enantiómeros para ser empleados como patrones en el desarrollo de los métodos analíticos.
2. Conjugar los haptenos a diferentes proteínas portadoras y/o enzimas para generar una colección de bioconjugados proteicos necesarios tanto para el proceso de inmunización (bioconjugados inmunizantes) como para los ensayos ELISA (bioconjugados de ensayo) en diferentes formatos.

3. Inmunizar ratones con los diferentes conjugados inmunogénicos con vistas a producir anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de generación de hibridomas.
4. Caracterizar los anticuerpos monoclonales obtenidos, en términos de afinidad y especificidad, empleando ensayos tipo ELISA competitivos en formato de conjugado inmovilizado (indirecto) y de anticuerpo inmovilizado (directo).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Diseño de los haptenos

La obtención de anticuerpos de elevada afinidad y selectividad frente una determinada molécula, y por tanto la sensibilidad y especificidad de los métodos inmunoanalíticos que se desarrollen a partir de dichos anticuerpos, depende en gran medida del análogo funcionalizado (hapteno) que se utilice en la preparación del conjugado inmunogénico.<sup>117,118</sup> La relación estructural y electrónica que existe entre la molécula de referencia y el hapteno, y la forma en que el esqueleto de éste se expone al sistema inmune, condicionan la naturaleza del sitio de unión que se generará en el anticuerpo producido. Por lo tanto, es lógico que la etapa inicial de diseño y síntesis de los haptenos sea considerada fundamental en todo el proceso de desarrollo de un inmunoensayo para analitos de bajo peso molecular. Existe consenso en que el diseño del hapteno debe conservar, en la medida de lo posible, la mayoría de las características fisicoquímicas de la molécula de referencia, maximizando la similitud del entorno estérico y electrónico, así como, en el caso de moléculas flexibles, el grado de libertad conformacional.<sup>71,119</sup>

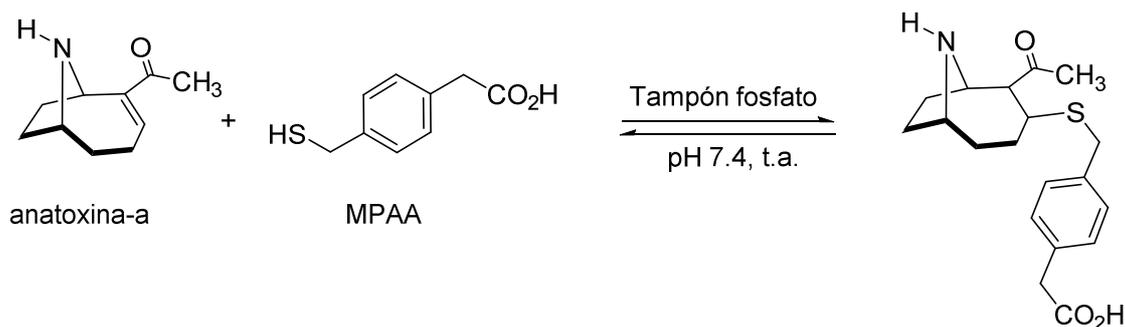
Por otro lado, aun cuando hoy en día existen potentes herramientas computacionales de modelado molecular que permiten determinar con precisión las características electrónicas y conformacionales de una determinada molécula, en la práctica el diseño y preparación de una batería de análogos estructurales (haptenos regioisoméricos) es la estrategia más utilizada para la obtención de anticuerpos de elevada afinidad hacia moléculas de pequeño tamaño. Se trata de incorporar el brazo espaciador por diferentes posiciones del analito, conservando al máximo su esqueleto y grupos funcionales, de tal modo que se cubran modos complementarios de presentación del esqueleto de la molécula al sistema inmune. Este tipo de estrategia tiene una ventaja adicional, desde el punto de vista de desarrollo del inmunoensayo final, en cuanto que la batería de haptenos regioisoméricos sintetizados puede también utilizarse para la preparación de conjugados de ensayo usados en estrategias de heterología, que como se ha comentado en la

introducción permiten frecuentemente una mejora de la sensibilidad del inmunoensayo.

Para el diseño de los haptenos de anatoxina-a se han tenido en cuenta varios aspectos. La anatoxina-a es una molécula de pequeño tamaño con dos grupos funcionales reactivos; por un lado, el grupo amino puente del sistema bicíclico, de carácter básico y con capacidad nucleofílica para interactuar con centros ácidos y/o electrofílicos; y por otro, la agrupación cetónica  $\alpha,\beta$ -insaturada, potencialmente susceptible de experimentar fácilmente adiciones tipo Michael con nucleófilos adecuados,<sup>120,121,122</sup> tales como algunos que pueden estar presentes en el medio fisiológico natural durante el proceso de inmunización, por ejemplo los grupos sulfhidrilo presentes en moléculas como el glutatión o las propias proteínas. Todas estas características estructurales y reactivas de la anatoxina-a pueden estar relacionadas con el hecho de que, hasta el momento, y a pesar de su elevado interés tecnológico, no se hayan obtenido anticuerpos adecuados para el desarrollo de un inmunoensayo que permita la detección sensible de la misma.

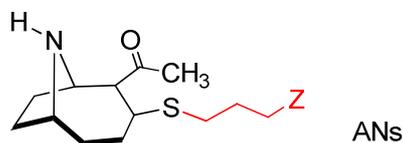
En base a estas consideraciones, y previamente a la planificación de los haptenos a sintetizar, se llevó a cabo un estudio de la capacidad de reacción de anatoxina-a con un nucleófilo del tipo indicado en el párrafo precedente. Como modelo de nucleófilo se utilizó el ácido 4-mercaptofenilacético, MPAA (**Esquema 3.1**); la anatoxina-a se trató con el mencionado tiol (1.5 equiv) en tampón fosfato (100 mM, pH 7.4) a temperatura ambiente y con agitación magnética, y se controló la evolución de la reacción por HPLC-MS a los 15 min, 2 h, 4 h y 23 h.

El resultado de este experimento indicó que la anatoxina-a reacciona rápidamente (15 minutos) con el tiol para dar el producto de adición conjugada a la agrupación enona, si bien el producto de adición evoluciona aparentemente en estas condiciones de forma reversible para regenerar parcialmente después de 23 h la anatoxina-a de partida, un proceso que parece estar propiciado por la oxidación irreversible del tiol al correspondiente disulfuro y que con el tiempo desplazaría el equilibrio en la dirección indicada.<sup>123</sup>



**Esquema 3.1.** Reacción de anatoxina-a con tioles

Aunque es aventurado extrapolar el resultado obtenido en estas condiciones de reacción a las condiciones fisiológicas *in vivo* que se dan en el proceso de inmunización, pensamos que podría ser interesante aprovechar la reactividad de la anatoxina-a con los grupos sulfhidrilo para generar un derivado tiolado de la misma, con una estructura genérica como la representada en la **Figura 3.1**, hapteno ANs, a sabiendas de que tanto desde el punto de vista de similitud estructural de este hapteno con anatoxina-a, como por los resultados obtenidos en la reacción *in vitro*, no se tenían garantías de que este tipo de derivado fuese el más adecuado para inducir la respuesta inmune deseada.



**Figura 3.1.** Estructura de hapteno ANs

Adicionalmente a este tipo de hapteno, y siguiendo una aproximación más racional, también se diseñaron otros haptenos en los que se respeta íntegramente el esqueleto y grupos funcionales de anatoxina-a, incorporando un brazo espaciador hidrocarbonado sobre el átomo de nitrógeno, hapteno AN $n$ , el grupo carbonilo, hapteno AN $c$ , y el grupo metilo, hapteno AN $m$  (**Figura 3.2**). La similitud estructural de los haptenos AN $n$  y AN $m$  con anatoxina-a es obvia, ya que en ambos casos el brazo espaciador está situado en posiciones de la misma que no comprometen seriamente la libertad conformacional del esqueleto que comparten con

anatoxina-a,<sup>vii,75,124,125,126</sup> habiéndose escogido una longitud relativamente corta del brazo espaciador, cuatro átomos de carbono, para posibilitar una adecuada separación del resto proteico durante la presentación al sistema inmune del conjugado inmunogénico, sin que se produzca un excesivo reconocimiento de la propia cadena del brazo espaciador en relación al esqueleto de anatoxina-a.

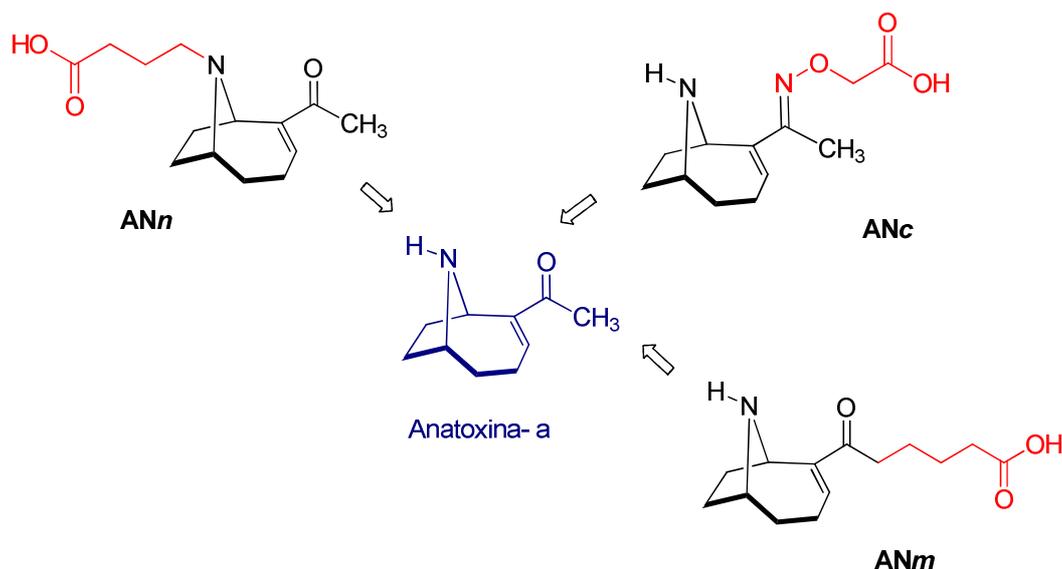


Figura 3.2. Estructura de los haptenos ANn, ANc y ANm

En el caso del hapteno ANc, se sustituye la agrupación enona de anatoxina-a por una agrupación oximínica  $\alpha,\beta$ -insaturada, un intento de reducir la reactividad del doble enlace en reacciones de adición tipo Michael, y se reduce drásticamente la longitud del brazo espaciador a dos átomos de carbono al objeto de que el reconocimiento molecular en los sitios de unión de los anticuerpos generados se centre en la parte del esqueleto común con anatoxina-a.

Finalmente, y ante la posibilidad de que el reducido tamaño de anatoxina-a condicionase en exceso la generación de anticuerpos de elevada afinidad, se ha abordado también el diseño de un hapteno correspondiente a un derivado de la misma. Mediante esta estrategia se pretende incrementar el tamaño de la molécula

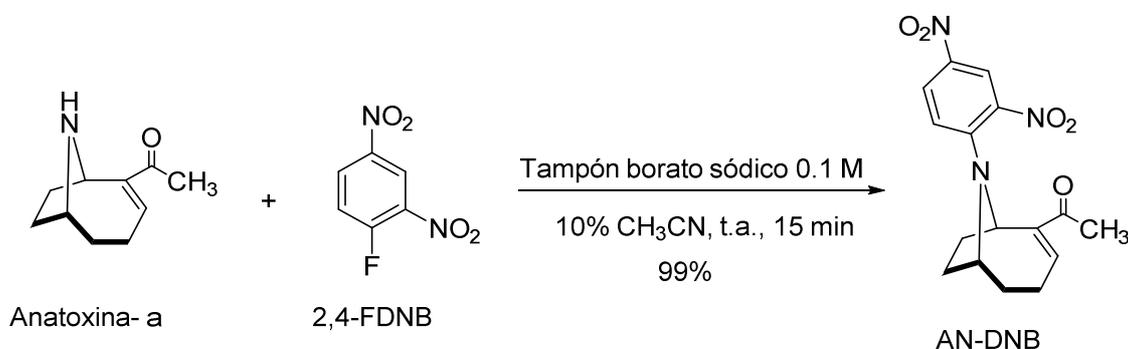
<sup>vii</sup> Desde el punto de vista inmunológico, es importante la posición de anclaje del hapteno a la proteína, y por lo tanto del brazo espaciador en el mismo. Se han descrito ejemplos en los que brazos espaciadores unidos directamente o en posiciones próximas a los grupos funcionales producen anticuerpos de baja afinidad<sup>75,123</sup> y otros con un resultado contrario.<sup>124</sup> Haptenos de este último tipo se han utilizado, por ejemplo, para la generación de anticuerpos frente a moléculas relevantes como cocaína, microcistinas o nodularinas.<sup>125,126</sup>

a detectar, lo que debería aumentar sustancialmente su carácter inmunogénico. En este caso, y suponiendo que pueden obtenerse anticuerpos adecuados frente al derivado de anatoxina-a, la determinación de la toxina mediante un inmunoensayo implicaría una etapa previa adicional de derivatización, un procedimiento que, por otro lado, es bastante común en diversas metodologías analíticas utilizadas para la cuantificación de anatoxina-a<sup>127</sup> y otros analitos de bajo peso molecular,<sup>128,129,130</sup> y que también se ha utilizado en el contexto de procedimientos analíticos basados en anticuerpos.<sup>131,132,133</sup>

A la hora de diseñar un derivado adecuado de anatoxina-a para utilizarlo como hapteno se han tenido en cuenta los diferentes tipos de reactivos que han sido utilizados para su derivatización en los procedimientos de análisis basados en HPLC y GC, y que ya han sido comentados en la introducción. Uno de los reactivos más utilizados para la derivatización de anatoxina-a con este fin es el 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F),<sup>126</sup> un agente derivatizante muy reactivo que reacciona con aminas primarias y secundarias en condiciones muy suaves originando derivados fluorescentes.<sup>134</sup> Desde el punto de vista de la reactividad, un compuesto relacionado con NBD-F es el conocido como reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno, 2,4-FDNB),<sup>135,136,137</sup> el cual también puede reaccionar con aminas para dar el correspondiente producto de adición-eliminación. Aunque no ha sido utilizado para la derivatización de anatoxina-a en procedimientos analíticos cromatográficos, pensamos que podría ser adecuado como agente derivatizante en el contexto del desarrollo de un inmunoensayo para un derivado de anatoxina-a. Al objeto de evaluar la viabilidad de este reactivo como agente derivatizante, llevamos a cabo un estudio preliminar de esta reacción.

En los primeros ensayos de derivatización se hizo reaccionar anatoxina-a, en forma de sal del ácido trifluoroacético, con 5.0 equivalentes de 2,4-FDNB en borato sódico 0.1 M, pH 9.6, a temperatura ambiente, controlándose la evolución de la reacción por HPLC en fase reversa, tal como se detalla en la parte experimental (**apartado 5.4.1**). En estas condiciones se apreció una reacción lenta entre la anatoxina-a y el reactivo de Sanger para generar el correspondiente producto de

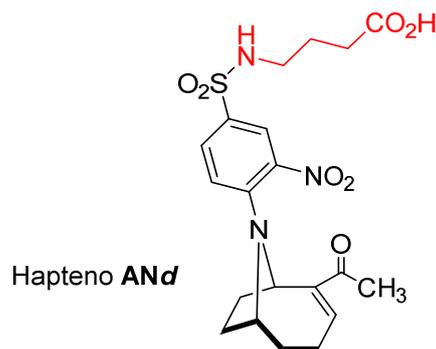
sustitución nucleofílica del átomo de flúor, compuesto AN-DNB (**Esquema 3.2**). Sin embargo, la velocidad de la reacción se incrementó notablemente cuando el medio de reacción se sustituyó por una mezcla 1:1 de tampón borato y acetonitrilo, de tal modo que en este nuevo medio la reacción prácticamente se completó en 15 minutos. Experimentos posteriores mostraron que la cantidad de acetonitrilo podía reducirse al 10% sin que se observaran cambios sustanciales de la velocidad de reacción. Este último aspecto es particularmente relevante, puesto que son condiciones en las cuales son solubles las proteínas y anticuerpos y, por lo tanto, compatibles con el desarrollo de un inmunoensayo sin tener que diluir la muestra a analizar.



**Esquema 3.2.** Reacción de anatoxina-a con 1-fluor-2,4-dinitrobenceno

A la vista de los resultados obtenidos en la reacción de anatoxina-a con el reactivo 2,4-FDNB, parecía que este compuesto podría ser adecuado como agente derivatizante en el desarrollo de un inmunoensayo de anatoxina-a basado en la derivatización previa de la misma. En base a este supuesto, se consideró que podrían generarse anticuerpos adecuados para el reconocimiento de este derivado utilizando como hapteno un análogo del mismo con la estructura mostrada en la **Figura 3.3**, hapteno ANd.

Es de esperar que la estructura de este hapteno, que incorpora dos elementos estructurales potencialmente muy inmunogénicos, como son las agrupaciones nitrobenceno y sulfonamida, mimetice adecuadamente la estructura del derivado AN-DNB y sea capaz por tanto de inducir la generación de anticuerpos específicos y selectivos para el mismo.



**Figura 3.3.** Hapteno ANd, análogo estructural del derivado de anatoxina-a con 2,4-FDNB

### 3.2 Síntesis de haptenos de anatoxina-a y preparación de bioconjugados

En los siguientes apartados se describe la estrategia sintética que se ha seguido para la preparación de los diferentes haptenos y correspondientes bioconjugados, así como los detalles del trabajo desarrollado en cada caso para la preparación de los mismos.

#### 3.2.1 Preparación del hapteno ANs: Acceso directo a bioconjugados proteicos

En principio, la preparación de un hapteno como ANs, que incorpora un resto tioalquílico sobre el carbono terminal de la agrupación enona de anatoxina-a, podría prepararse, en base a los estudios previos realizados sobre la reactividad de anatoxina-a con tioles, vía una reacción de adición nucleofílica tipo Michael de un ácido  $\omega$ -mercaptoalcanoico o un derivado del mismo. La posterior activación del grupo carboxilato posibilitaría el anclaje de este tipo de derivado a las proteínas portadoras a través de la formación de un enlace amida (**Figura 3.4a**). Un procedimiento alternativo que simplifica experimentalmente la preparación del conjugado hapténico se basa en la tiolación previa de la proteína, al objeto de incrementar el bajo número de grupos sulfhidrilo habitualmente presentes, a través de la incorporación de restos tioalquílicos sobre los grupos amino terminales de los restos de lisina de la proteína, para posteriormente utilizar los grupos sulfhidrilo incorporados para la unión covalente de anatoxina-a a la proteína, opción que hemos utilizado en este trabajo (**Figura 3.4b**).

En primer lugar se llevó a cabo la reacción de tiolación de BSA con el reactivo de Traut (2-iminothiolane-HCl), un tioimidato cíclico que reacciona con los grupos

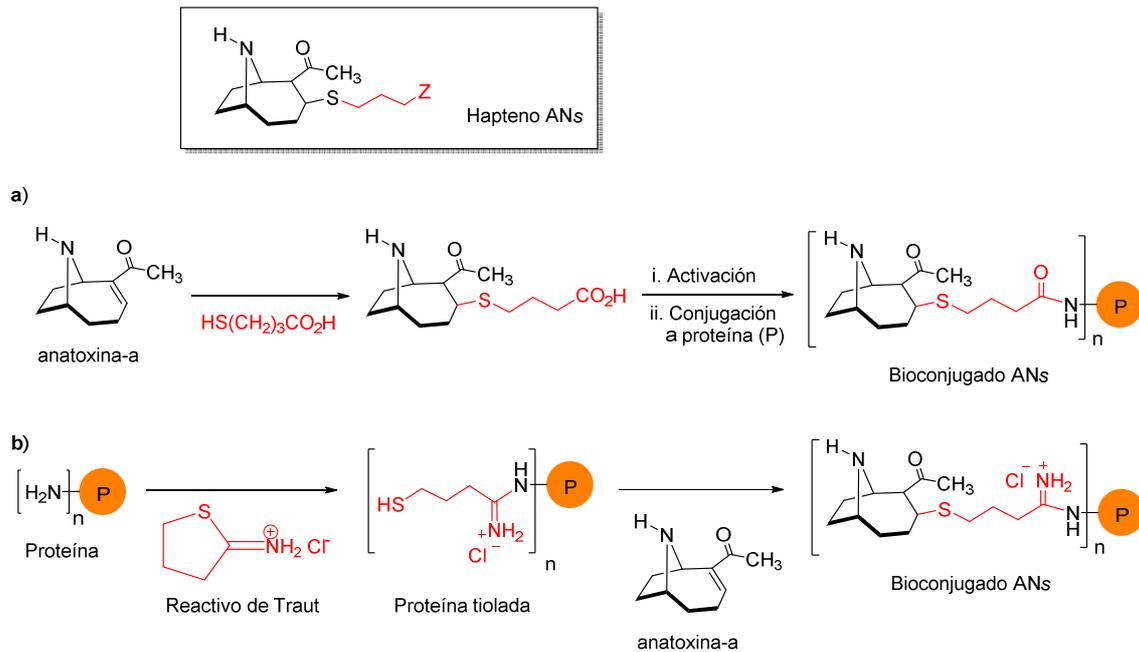
amino libres ( $\text{NH}_2$ ) de la proteína introduciendo grupos sulfhidrilo (SH), pero manteniendo las propiedades de carga de los grupos amino originales.<sup>138,139,140,141</sup> Esta funcionalización se llevó a cabo mediante el tratamiento de BSA en disolución acuosa a pH básico (tampón fosfato 50 mM, pH 8.0) con el reactivo de Traut manteniendo un relación molar reactivo-proteína 42:1. La BSA tiolada (BSA-SH) se purificó por cromatografía de exclusión molecular y el grado de incorporación de los restos mercapto alquílicos se determinó por MALDI-TOF-MS, procedimiento que indicó el acoplamiento de 16–17 restos tioalquílicos disponibles para la conjugación con anatoxina-a.

Así pues, al objeto de obtener el conjugado inmunizante BSA-ANs, se trató la proteína modificada BSA-SH con anatoxina-a como sal de formiato,<sup>viii</sup> utilizando una relación molar 80:1 de anatoxina-proteína tiolada. Después de 2 h de reacción y tras haber purificado el conjugado por cromatografía de exclusión, la eficacia de la conjugación se determinó empleando MALDI-TOF-MS.

El resultado indicó un promedio de 5-6 moléculas de anatoxina-a incorporadas por cada molécula de BSA-SH. Aunque la carga hapténica incorporada en el conjugado BSA-ANs resultó ser inferior a la inicialmente esperada en base a los grupos mercaptano incorporados a la proteína tiolada, se pensó que, en principio, podría ser suficiente para utilizar este conjugado en el proceso de inmunización. Aunque, por lo general, densidades hapténicas más elevadas tienden a incrementar la intensidad de la respuesta inmune, también es conocido que el título y afinidad de los anticuerpos producidos no se incrementa linealmente con el aumento del número de haptenos acoplados a la proteína portadora. Adicionalmente, aunque la respuesta inmune inducida por un conjugado con menor densidad hapténica tiende a ser menos intensa, con frecuencia da lugar a anticuerpos de mayor afinidad.<sup>117,142,143</sup>

---

<sup>viii</sup> La anatoxina-a utilizada en este trabajo para la preparación de todos los haptenos y bioconjugados fue preparada previamente como mezcla racémica en forma de sal de amonio (clorhidrato, formiato o trifluoroacetato), tal como se describe en apartados posteriores de esta memoria.



**Figura 3.4.** Preparación de un bioconjugado hapteno ANs-Proteína. **(a)** Vía de funcionalización de anatoxina-a con un ácido mercaptoalquílico seguido de conjugación a la proteína; **(b)** vía de funcionalización de los grupos amino terminales de la proteína con el reactivo de Traut seguido de conjugación de anatoxina-a a la proteína tiolada.

Paralelamente a la preparación del conjugado inmunogénico de la BSA tiolada, también se llevó a cabo la preparación de un conjugado de tapizado análogo, en particular de OVA (conjugado OVA-ANs), para ser utilizado en el proceso de evaluación de la respuesta inmune con BSA-ANs. En primer lugar, se procedió a la tiolación de OVA, para posteriormente realizar la conjugación de anatoxina-a a la OVA tiolada obtenida. En estos casos se utilizó un exceso de 30 equivalentes del reactivo de Traut y de 46 equivalentes de anatoxina-a respecto de OVA u OVA-tiolada, respectivamente.

El grado de conjugación de anatoxina-a en el hapteno OVA-ANs, determinado también por MALDI-TOF-MS, fue de aproximadamente 6 moléculas de anatoxina-a por unidad proteica; un valor habitual y adecuado para un conjugado de ensayo de este tipo.<sup>ix</sup>

<sup>ix</sup> Aunque para el resto de haptenos obtenidos en este trabajo se ha llevado a cabo la preparación del correspondiente conjugado proteico con la enzima HRP, que eventualmente se utiliza como trazador enzimático en los ensayos ELISA competitivos de formato directo, en este caso se decidió no llevar a cabo la preparación del conjugado HRP-ANs debido a un posible efecto de desactivación enzimática de la proteína durante la etapa de tiolación con el reactivo de Traut.

En la **Tabla 3.1** se recogen los valores de relación molar que indican el número de haptenos conjugados por unidad proteica obtenidos en cada etapa para la obtención de los conjugados inmunizantes y de ensayo para el hapteno ANs.

**TABLA 3.1.** Valores de RM de los conjugados proteicos de ANs

	$RM_0$	$m/z$	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/\text{hapteno}$	RM
BSA	-	66431.0	-	-	-
BSA-SH	42	68698.1	2267.2	137.0	16.5
BSA-AN <sub>s</sub>	80	69655.0	956.9 <sup>a</sup>	166.1	5.8
OVA	-	42875.0	-	-	-
OVA-SH	30	44525.0	1650.0	137.0	12.0
OVA-AN <sub>s</sub>	46	45596.0	1071.0 <sup>b</sup>	166.1	6.4

<sup>a</sup> referido a la masa de BSA-SH; <sup>b</sup> referido a la masa de OVA-SH

### 3.2.2 Síntesis de los haptenos AN<sub>n</sub>, AN<sub>m</sub> y AN<sub>c</sub>

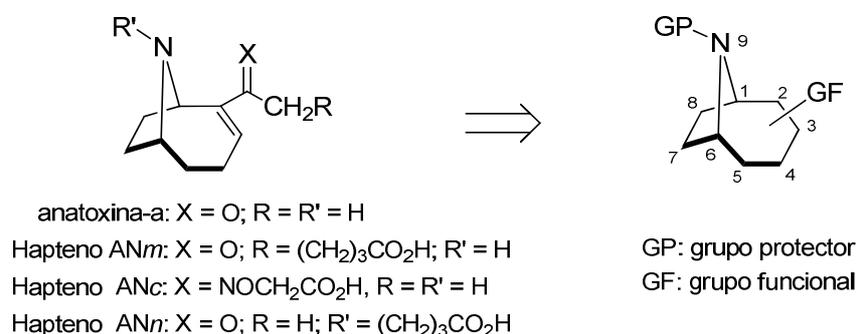
#### 3.2.2.1 Obtención del esqueleto azabíclico común a anatoxina-a y a los haptenos

La característica estructural común de los diferentes haptenos diseñados y anatoxina-a es el sistema bicíclico de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano, por lo que la estrategia sintética planteada para su preparación, y como se verá más adelante también para la síntesis de la propia anatoxina-a, se basó en la preparación de un intermedio clave con este esqueleto y una funcionalización adecuada para su posterior transformación en cada uno de los haptenos (**Figura 3.5**).<sup>x</sup>

Inicialmente se exploraron varias aproximaciones para la preparación de un sistema bicíclico de este tipo basadas en procedimientos descritos en la literatura para la preparación de sistemas bicíclicos análogos,<sup>90,144</sup> al objeto de evaluar cuál de ellas podría ser más adecuada por eficiencia sintética y adecuación de la funcionalización obtenida para su transformación en los haptenos objetivo. A

<sup>x</sup> Aunque, como se ha indicado previamente, la síntesis de los haptenos preparados en este trabajo y los intermedios de su síntesis no es enantioselectiva y lógicamente conduce a una mezcla racémica, en los esquemas sólo se representa uno de los enantiómeros, el correspondiente a la estereoquímica absoluta del esqueleto de la (+)-anatoxina-a natural (ver más adelante, apartado **3.3**)

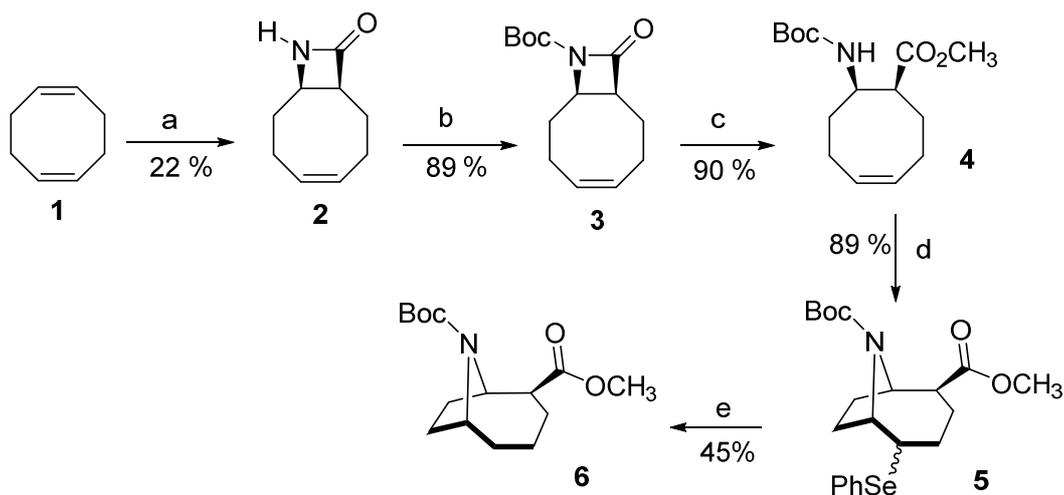
continuación, se describen dos de las que se llevaron a cabo y permitieron completar la estructura del sistema bicíclico.



**Figura 3.5.** Intermedio clave requerido para la síntesis de los haptenos con esqueleto de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano

La primera de las estrategias abordadas se basa en la preparación inicial de un sistema de 8-amino-ciclooct-4-eno-1-carboxilato (**4**), vía una reacción de cicloadición de isocianato de clorosulfonilo (CSI) a uno de los dobles enlaces del 1,5-ciclooctadieno (**1**), seguido de desprotección del grupo *N*-clorosulfonilo de la β-lactama inicialmente generada y apertura posterior del anillo lactámico por metanolisis (**Esquema 3.3**).<sup>80,145,146</sup> La etapa clave en la construcción del anillo aza-bicíclico implica una ciclación intramolecular del grupo amino con el doble enlace de **4** promovida por bromuro de fenilselenio. La síntesis del sistema de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano **6** se completa con una eliminación reductiva del grupo fenilselenio.<sup>147,148,149,150</sup>

Aunque la ruta anterior permitía obtener el esqueleto básico de los haptenos con una funcionalización potencialmente adecuada, el relativamente elevado número de etapas y el bajo rendimiento de alguna de ellas nos llevaron a evaluar otras alternativas para la preparación del esqueleto de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano.



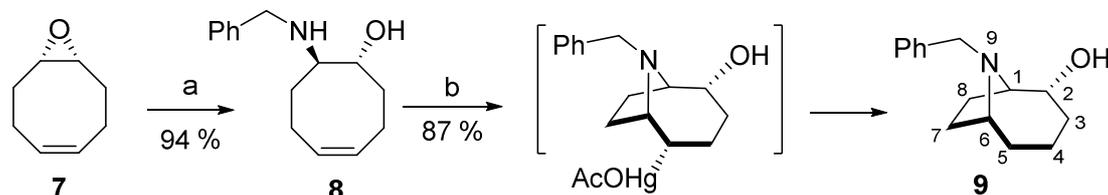
(a) i,  $\text{CSi}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anh,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   $0^\circ\text{C}$ ; ii,  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . (b)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMAP}$ , t.a., 6h. (c)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMAP}$ ,  $\text{MeOH}$ , t.a., 12 h.; (d)  $\text{PhSeBr}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeCN}$ , t.a., 16 h. (e)  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{THF}$ ,  $\text{MeOH}$

**Esquema 3.3.** Síntesis del sistema de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano basado en una ciclación intramolecular de un aminocicloocteno

De las diversas posibilidades abordadas, la que mejores resultados proporcionó por su simplicidad, eficiencia y características funcionales del sistema bicíclico obtenido es la que se ilustra en el **Esquema 3.4**. La síntesis del alcohol aza-biciclo **9** sólo implica dos transformaciones sintéticas que se producen con un rendimiento muy elevado. La primera de ellas es una apertura nucleofílica  $\text{S}_{\text{N}}2$  del anillo de oxirano del producto comercial 9-oxabicyclo[6.1.0]non-4-eno (**7**) por tratamiento con 2 equivalentes de bencilamina en  $\text{MeOH}$  promovida por microondas. La reacción es muy eficiente en estas condiciones, con la ventaja adicional de que permite la purificación del producto de apertura, el *trans*-amino-alcohol **8**, mediante una simple cristalización de hexano del crudo obtenido tras la concentración a sequedad de la mezcla de reacción, lo cual facilita el escalado para la preparación del sistema aza-bicíclico.

El amino-alcohol obtenido se pudo convenientemente caracterizar por espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y experimentos bidimensionales. Las señales características del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostraron el desplazamiento químico característico de los protones aromáticos sobre 7.30 ppm, de los dos protones olefínicos a  $\delta$  5.60 y 5.67 ppm, y de los protones diastereotópicos del grupo

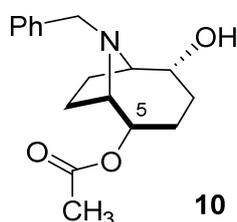
metileno bencílico a  $\delta$  3.81 ppm, con un patrón de acoplamiento típico de un sistema AB.



(a)  $\text{BnNH}_2$ , MeOH, MW, 110 °C, 16 h. (b) i,  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , 0 °C, 1 h; ii, NaOH 3M,  $\text{NaBH}_4$

**Esquema 3.4.** Síntesis del sistema de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano basado en una ciclación intramolecular de un hidroxi-amino-cicloocteno

La etapa de ciclación que genera el anillo de 9-azabicyclo[4.2.1]nonano se llevó a cabo promovida por el catión acetoxi-mercurinio ( $\text{AcOHg}^+$ ) en condiciones muy suaves y conduce al correspondiente intermedio organomercurio que es directamente reducido con borohidruro sódico al derivado aza-bicíclico **9**. Hay que destacar que utilizando las condiciones optimizadas de reacción que se han mencionado no se observó la formación en cantidades significativas de ningún otro producto secundario de reacción, algo que sí ocurrió en las primeras condiciones ensayadas y en algunos de los procedimientos descritos en la literatura para procesos relacionados.<sup>146,147</sup> En particular, cuando la reacción de amino-mercuriación intramolecular se lleva a cabo a temperatura ambiente por un tiempo más prolongado se obtuvieron, tras el proceso de desmercuriación y adicionalmente al alcohol **9**, cantidades variables del hidroxi-acetato **10** (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Subproducto de la ciclación electrofílica intramolecular en la reacción de formación del sistema 9-azabicyclo[4.2.1]nonano

Este producto se obtiene incluso como producto mayoritario del proceso de ciclación si la primera etapa del mismo se mantiene durante un tiempo

---

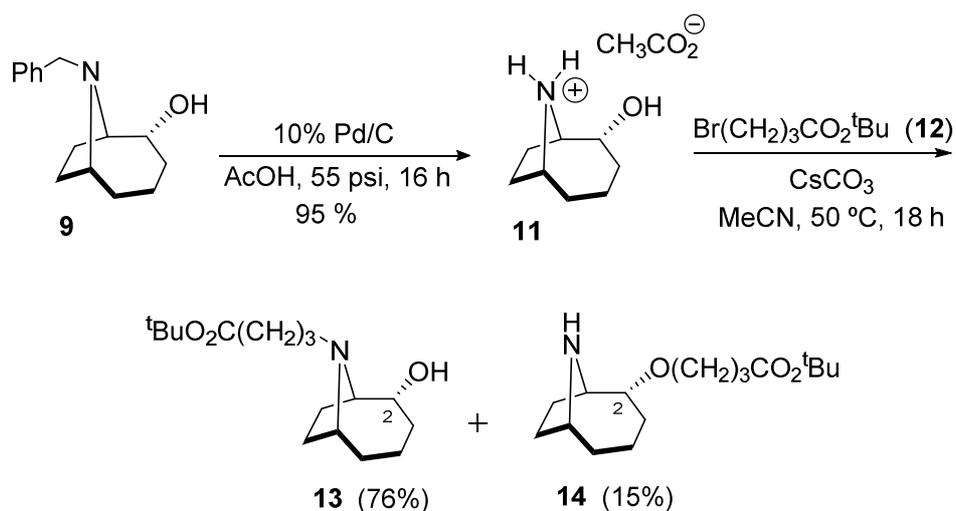
suficientemente largo. La formación del compuesto **10**, que ya ha sido observada en procesos de ciclación análogos,<sup>151</sup> es probablemente debida a la reacción secundaria de acetólisis que experimenta el intermedio organomercúrico generado inicialmente en el proceso de amino-mercuriación.<sup>152</sup>

El derivado aza-bicíclico **9**, que posee el núcleo común que comparten los haptenos y anatoxina-a, dispone de una funcionalización adecuada para poder llevar a cabo las transformaciones requeridas para la preparación de los diversos haptenos objetivo. Por un lado, el átomo de nitrógeno puente se encuentra bloqueado por un grupo bencilo, fácilmente removible en el momento requerido por hidrogenólisis y, por otro, presenta una función hidroxílica en C-2, que sirve para la elaboración de la agrupación carbonílica insaturada común a todos los objetivos sintéticos.

### 3.2.2.2 Síntesis del hapteno AN $n$

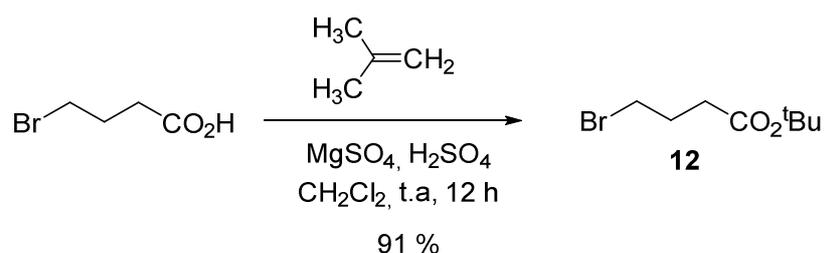
Una vez que pudimos acceder con relativa facilidad a la formación del sistema 9-azabicyclo[4.2.1]nonano, se abordó en primer lugar la preparación del hapteno AN $n$ . Inicialmente pretendimos, partiendo de **9**, introducir el brazo espaciador en el nitrógeno puente del sistema bicíclico para posteriormente abordar las modificaciones químicas necesarias para la elaboración del grupo acetilo conjugado a partir de la función hidroxílica.

Con esa finalidad, se realizó la *N*-desbencilación del aminoalcohol **9** promovida por una reacción de hidrogenólisis catalizada por Pd en ácido acético glacial bajo una presión de 55 psi de H<sub>2</sub> durante 16 h. En este tipo de reacción el medio ácido resulta ser clave, ya que no sólo actúa como solvente, sino que impide, debido a la formación *in situ* de la sal de amonio del ácido, que aminas de bajo peso molecular como la nuestra se volatilicen o puedan incluso experimentar procesos de oxidación.<sup>153,154</sup> Después de la separación del catalizador por filtración y eliminación azeotrópica del exceso de ácido acético con CCl<sub>4</sub>, se obtuvo el producto de desprotección en forma de sal de amonio del ácido acético **11** (Esquema 3.5), el cual no se purificó sino que fue utilizado directamente en la siguiente etapa de *N*-alquilación.



**Esquema 3.5.** Introducción del brazo espaciador carboxilado del hapteno AN $n$

Previamente se llevó a cabo la preparación del agente alquilante necesario, el 4-bromobutanoato de *tert*-butilo (**12**), a través de una reacción de esterificación en la que se utilizó ácido 4-bromobutanoico, disponible comercialmente, isobuteno y un catalizador ácido (**Esquema3.6**).<sup>155</sup> El gas isobuteno se mantuvo confinado en un matraz sellado junto con el ácido orgánico disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y cantidades catalíticas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adsorbido sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> actúa protonando la olefina y generando el carbocatión *tert*-butilo correspondiente, mientras que el MgSO<sub>4</sub> secuestra restos de humedad, evitando la hidratación del isobuteno.



**Esquema 3.6.** Preparación del 4-bromobutanoato de *tert*-butilo

Para introducir el brazo espaciador a través del nitrógeno puente por un proceso de *N*-alquilación, prestamos especial atención a la selección de la base y las condiciones de reacción debido a la presencia de la agrupación alcohólica en **9**, también susceptible de experimentar un proceso de *O*-alquilación.<sup>156</sup> Se decidió utilizar Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base debido a su conocida capacidad catalítica en procesos de *N*-alquilación,<sup>157</sup> además de sus particulares propiedades físicas y químicas (alta

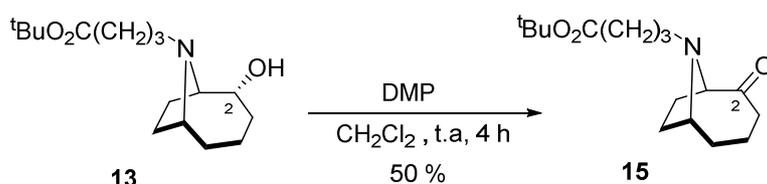
solubilidad en gran variedad de disolventes orgánicos, basicidad adecuada y estabilidad). La reacción se llevó a cabo empleando un exceso de 3.0 equivalentes de base en MeCN, con la finalidad de neutralizar la agrupación amonio de **9**, favorecer la desprotonación del grupo amino y catalizar su ataque nucleofílico sobre el bromuro **12**, equivalente sintético del brazo espaciador carboxilado en el hapteno, también utilizado en un exceso de 2.5 equivalentes. Después de mantener la reacción a reflujo de 50 °C durante 18 h y el correspondiente proceso cromatográfico, se obtuvo el alcohol *N*-alquilado **13**, con un rendimiento del 76%, y el producto de *O*-alquilación **14** con un rendimiento del 15% (**Esquema 3.5**).

La asignación de la estructura de los productos *N*- y *O*-alquilados se realizó de forma inequívoca por la diferencia existente en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para las señales correspondientes a las agrupaciones metileno contiguas al heteroátomo en cada uno de los productos, con desplazamientos químicos de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  a  $\delta$  2.58/55.6 y 4.33/64.2 ppm para **13** y **14**, respectivamente.

Una vez incorporado el brazo espaciador como éster *tert*-butílico por el grupo amino del sistema bicíclico, las siguientes etapas de la síntesis se dirigieron a la formación de la agrupación acetilo  $\alpha,\beta$ -insaturada, tal como se había contemplado al inicio de este apartado. Para acceder a ello, pensamos que una vez generado el producto de oxidación de **13** en C-2, podría utilizarse el grupo carbonilo formado en esta posición para transformarlo en el correspondiente enol triflato, una forma no sólo de introducir la insaturación requerida entre las posiciones C-2 y C-3, sino también de disponer en C-2 de una agrupación funcional, un grupo trifluorosulfonato de vinilo, susceptible de ser utilizado en reacciones de acoplamiento cruzado de diverso tipo catalizadas por Pd(0) para la incorporación del grupo acetilo.<sup>158,159,160</sup>

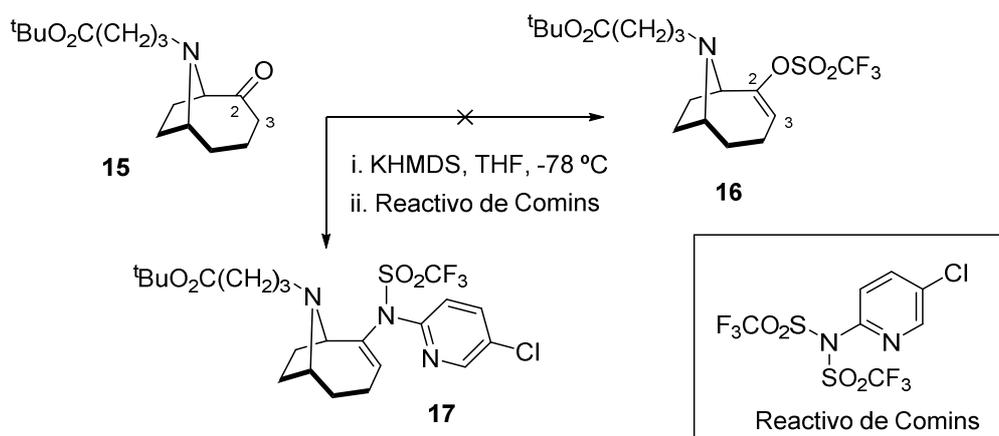
Tal como se recoge en el **Esquema 3.7**, la etapa de oxidación del alcohol bicíclico **13** se realizó utilizando como oxidante el periodinano de Dess-Martin (DMP),<sup>161</sup> proceso que permitió obtener el compuesto carbonílico **15** con un rendimiento moderado del 50%, aunque también fue posible recuperar cantidades variables del alcohol de partida sin reaccionar (10-15%). Con la finalidad de mejorar

el rendimiento, se evaluaron diferentes modificaciones de las condiciones de oxidación con el reactivo de Dess-Martin, como la adición de piridina,<sup>162</sup> además de otras estrategias de oxidación como el uso de TPAP/NMO<sup>163</sup> u oxidación de Swern.<sup>164</sup> No obstante, en ninguna de estas condiciones se logró mejorar los rendimientos previamente obtenidos con DMP.



Esquema 3.7. Oxidación del alcohol bicíclico **13**

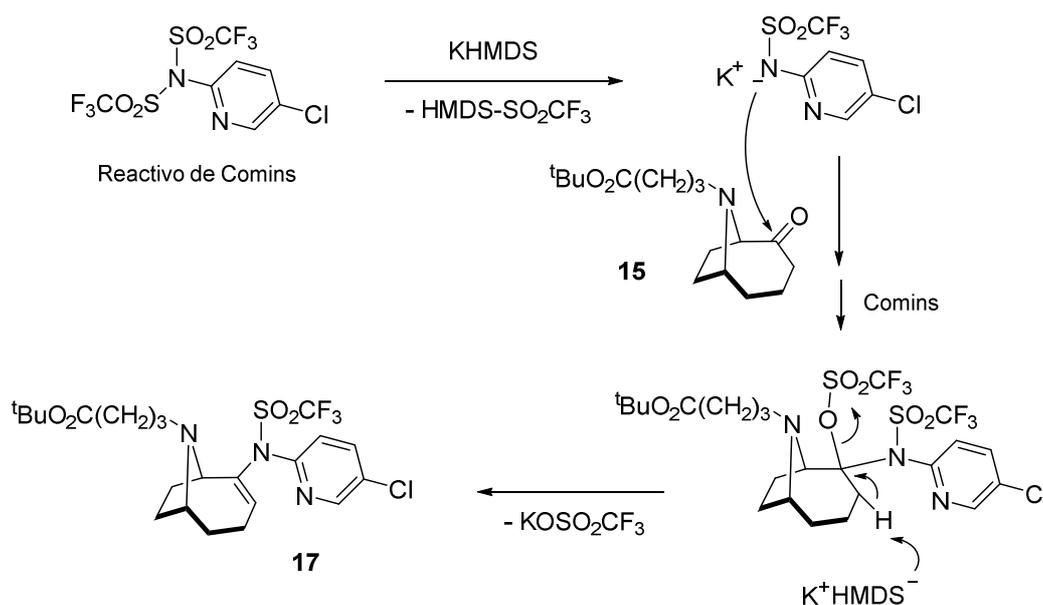
El tratamiento de la cetona *N*-alquilada **15** con 2 equivalentes de *bis*(trimetilsilil)amida potásica (KHMDs) en THF a baja temperatura para generar el correspondiente enolato de litio, seguido de la adición de un exceso del reactivo de Comins [*N*-(5-cloro-2-piridinil)*bis*(trifluorometanosulfonamida)] y agitación durante 2 h, condiciones habituales para la generación de un enol triflato de un compuesto cetónico,<sup>165,166,167</sup> no condujo al enol triflato esperado, *v.g.* compuesto **16** (Esquema 3.8), sino a un producto que por espectrometría de masas se correspondía con la fórmula molecular  $C_{22}H_{29}N_3O_4F_3SCl$  y al que, en base a los datos espectroscópicos de RMN, se le asignó tentativamente la estructura **17**.



Esquema 3.8. Intento de formación del enol triflato de la cetona bicíclica **15**

A pesar de que la reacción de formación del enol triflato de **15** se llevó a cabo modificando algunas de las condiciones de reacción inicialmente empleadas, tales como temperatura o tiempo de reacción, en todos los casos se aisló el mismo producto. No se ha encontrado en la literatura ningún precedente de una reacción semejante, y no tenemos una idea definitiva de los motivos que justifican el curso seguido por la reacción en este caso.

Aunque sea a modo especulativo, pensamos que es posible que la presencia de la cadena carboxilada sobre el nitrógeno puente estuviese introduciendo un fuerte impedimento estérico sobre la posición C-3 del sistema bicíclico que impediría la enolización inicial de **15** con KHMDS, por lo que la reacción, una vez adicionado el reactivo de Comins, seguiría un curso distinto en el que estaría implicada la adición de un nucleófilo nitrogenado derivado del reactivo de Comins al grupo carbonilo de **15** y una posterior reacción de eliminación, tal como se ilustra en la **Figura 3.7**.



**Figura 3.7.** Mecanismo propuesto para la formación del derivado **17**

En cualquier caso, y dada la imposibilidad de acceder al enol triflato **16** y completar la elaboración de la agrupación acetilo por esta ruta, se buscó replantear la estrategia sintética para completar la estructura del hapteno AN $n$ . En esta nueva aproximación se decidió invertir el orden de reacciones para introducir el brazo

---

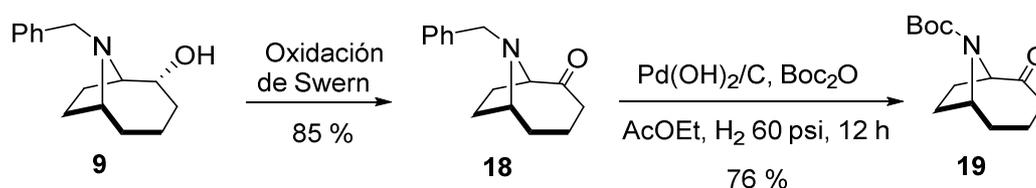
espaciador y preparar la agrupación enol triflato, llevando a cabo en primer lugar la preparación de esta última.

Así pues, en esta nueva ruta se comenzó por la transformación del alcohol bicíclico **9** en su correspondiente producto de oxidación. En este caso los mejores resultados del proceso de oxidación se obtuvieron con las condiciones de oxidación de Swern, que implicó el tratamiento de **9** con DMSO activado con cloruro de oxalilo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a baja temperatura y luego Et<sub>3</sub>N. El único inconveniente que presenta este procedimiento es la dificultad que se encontró en algunos casos para obtener el producto de oxidación, la *N*-bencilcetona **18** (Esquema 3.9), completamente libre de compuestos de azufre,<sup>168</sup> una circunstancia que demostró ser muy relevante en la siguiente etapa, una reacción de hidrogenólisis, ya que dichos compuestos inhibían al catalizador utilizado. Así, en algunos casos, para obtener el producto de oxidación completamente libre de restos de compuestos con azufre, fue necesario realizar dos procesos cromatográficos que, no obstante, proporcionaron siempre la cetona **18** con un rendimiento excelente, cercano o incluso superior al 85%.

La oxidación del alcohol **9** también se llevó a cabo con TPAP/NMO; aunque aparentemente, según se observaba por seguimiento de la reacción por cromatografía en capa fina, la reacción avanzaba relativamente limpia con la aparición de un único producto de oxidación y consumo total del material de partida, el rendimiento obtenido finalmente del producto de oxidación, tras el procesado y purificación cromatográfica correspondiente, fue siempre inferior al obtenido mediante la oxidación de Swern.

Con vistas a la necesaria desprotección del nitrógeno puente en las etapas posteriores de la síntesis, y puesto que ésta se realizaría una vez generado el doble enlace entre las posiciones C2-C3 del sistema bicíclico, se decidió llevar a cabo un cambio del grupo protector del átomo de nitrógeno en **18**, un grupo bencilo, por un grupo fácilmente eliminable en condiciones compatibles con la presencia del doble enlace. Se pensó como grupo más adecuado en el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (abreviado generalmente como *t*-Boc o simplemente Boc). Así,

la etapa siguiente implicó la *N*-desbencilación de la cetona **18** y re-protección *in situ* del grupo amino con un grupo *t*-Boc a través de un proceso de hidrogenólisis catalítica, utilizando una presión de H<sub>2</sub> de 60 psi en presencia de Pd(OH)<sub>2</sub> y dicarbonato de di-*terc*-butilo (Boc<sub>2</sub>O) en disolución con acetato de etilo (**Esquema 3.9**).



**Esquema 3.9.** Oxidación del alcohol **9** e intercambio de grupo protector sobre el nitrógeno puente

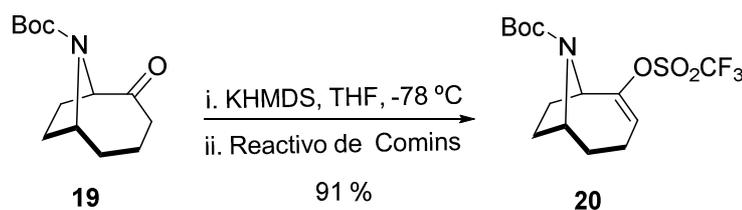
En estas condiciones, habitualmente utilizadas para aminas inestables o de bajo peso molecular,<sup>152,169</sup> se produce inicialmente la hidrogenólisis del enlace N-C liberando el grupo amino puente que es capturado rápidamente por el electrofílico Boc<sub>2</sub>O, conduciendo en una única operación sintética a la transformación de la *N*-bencil cetona **18** en la *N*-Boc cetona **19**, con un rendimiento global, tras el correspondiente proceso cromatográfico, del 76%, rendimiento análogo al descrito para esta transformación en sistemas estructuralmente relacionados.<sup>80,170,171</sup>

El cambio de grupo protector del nitrógeno puente es fácilmente observable en los espectros de RMN de la cetona **19**, en los que se observa la desaparición de las señales correspondientes al grupo *N*-bencilo y la aparición de las señales correspondientes al nuevo grupo *N*-Boc; en este sentido, es interesante señalar que la *N*-Boc cetona **19** existe en disolución como una mezcla 2:1 de rotámeros, tal como refleja la duplicidad de señales observables en los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, en los que se observan las señales correspondientes al grupo OCM<sub>3</sub> de la agrupación *N*-Boc de cada uno de los rotámeros [espectro de <sup>1</sup>H a 1.49/1.42 (CMe<sub>3</sub>); espectro de <sup>13</sup>C a 80.35/80.13 (CMe<sub>3</sub>) y 28.62/28.51 (CMe<sub>3</sub>)].

Una vez disponible la cetona bicíclica **19** se abordó su conversión en el correspondiente enol triflato, una transformación que como se ha descrito previamente no pudo completarse en el sistema bicíclico análogo que incorpora la

cadena hidrocarbonada sobre el nitrógeno puente, la cetona **15** (ver **Esquema 3.8**). En este caso, utilizando básicamente las mismas condiciones utilizadas previamente para **15**, la formación del enol triflato de la cetona **19** transcurre sin incidencias destacables proporcionando el correspondiente enol triflato **20** con un excelente rendimiento (**Esquema 3.10**), un resultado que viene a confirmar la influencia que tiene la cadena hidrocarbonada flexible en el comportamiento de la cetona **15** en estas condiciones de reacción.

La formación del enol triflato **20** resultó también evidente del análisis de sus espectros de RMN, destacando la presencia de las señales correspondientes al protón olefínico en el espectro de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  5.79/5.72 ppm y las de los carbonos olefínicos C-2 y C-3 en el espectro de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  154/153 y 121/120 ppm, respectivamente, así como la señal correspondiente al flúor en el espectro desacoplado de RMN de  $^{19}\text{F}$  a  $\delta$  -74.4 ppm.<sup>xi,172,173</sup>

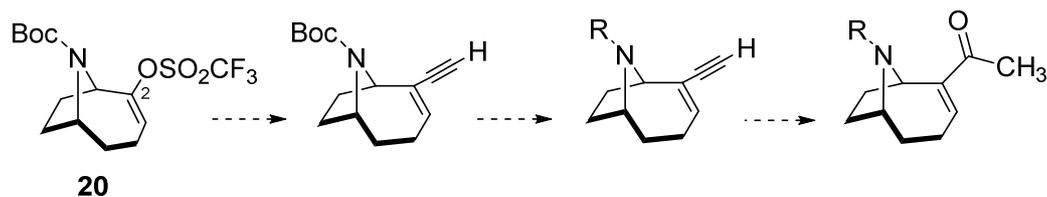


**Esquema 3.10.** Formación del enol triflato de la *N*-Boc cetona **19**

Motivados por el resultado obtenido, quedaba claro que se continuaría en esta línea de síntesis y que la etapa inmediata sería introducir una funcionalidad química que nos permitiera formar el grupo metilcarbonilo (acetilo). De entre las diferentes posibilidades disponibles para ello, se escogió un procedimiento basado en la sustitución del grupo triflato por un alquino terminal, que tras la hidratación del triple enlace conduciría al deseado grupo acetilo (**Figura 3.8**).<sup>174</sup> Según esta

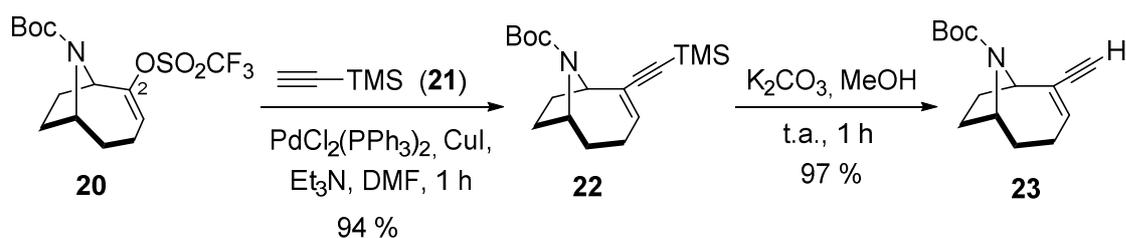
<sup>xi</sup> Como se ha señalado previamente para la *N*-Boc cetona **19**, todos los intermedios de las síntesis descritas en este trabajo en los que el átomo de nitrógeno puente está protegido como *N*-Boc se encuentran en disolución como una mezcla de dos rotámeros en equilibrio. La coexistencia de los dos rotámeros del enlace C-N<sup>172,173</sup> se refleja en la duplicidad de algunas de las señales en los espectros de RMN, tanto de  $^1\text{H}$  como  $^{13}\text{C}$ . Las señales de RMN que se han dado para el enol triflato **20** son las correspondientes al rotámero mayoritario. De igual forma, en adelante, cuando se haga referencia en este apartado a los datos espectroscópicos de RMN de otros intermedios con el grupo *N*-Boc, sólo se darán aquéllos que corresponden al rotámero mayoritario. Para más detalles, ver los datos espectroscópicos de cada compuesto en la parte experimental.

estrategia, la introducción de la cadena carboxilada (R) que constituye el brazo espaciador del hapteno AN*n* se introduciría una vez incorporado el grupo etinilo en C-2, dejando la hidratación del triple enlace para las etapas finales de la síntesis, una forma de evitar potenciales problemas de compatibilidad de la agrupación enona con las condiciones básicas requeridas para reacción de *N*-alquilación prevista para la incorporación de la cadena carboxilada.



**Figura 3.8.** Estrategia sintética para la elaboración del grupo acetilo

La incorporación del grupo etinilo implicó dos etapas. En primer lugar se llevó a cabo un acoplamiento cruzado tipo Sonogashira, catalizado por paladio, entre el viniltriflato **20** y el alquino terminal trimetilsililacetileno (**21**) (Esquema 3.11).<sup>175,176,177</sup> En este caso utilizamos  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$  como precursor del catalizador de Pd(0) y CuI como cocatalizador, además de  $\text{Et}_3\text{N}$  como base nitrogenada y DMF seca como disolvente. Después de mantener la reacción durante 1 h a temperatura ambiente, se obtuvo el enino conjugado trimetilsililado **22** con un rendimiento del 94%.



**Esquema 3.11.** Alquínización del enol triflato **20**

En los espectros de RMN de este alquino, también observable en disolución como una mezcla 1:4 de rotámeros, destaca el desplazamiento observado en el espectro de  $^1\text{H}$  de la señal del protón olefínico en relación al triflato de partida (6.12 ppm vs 5.79 ppm, respectivamente) y el singlete a campo alto ( $\delta$  0.16 ppm) que integra a 9 protones característico del grupo trimetilsilililo presente en la

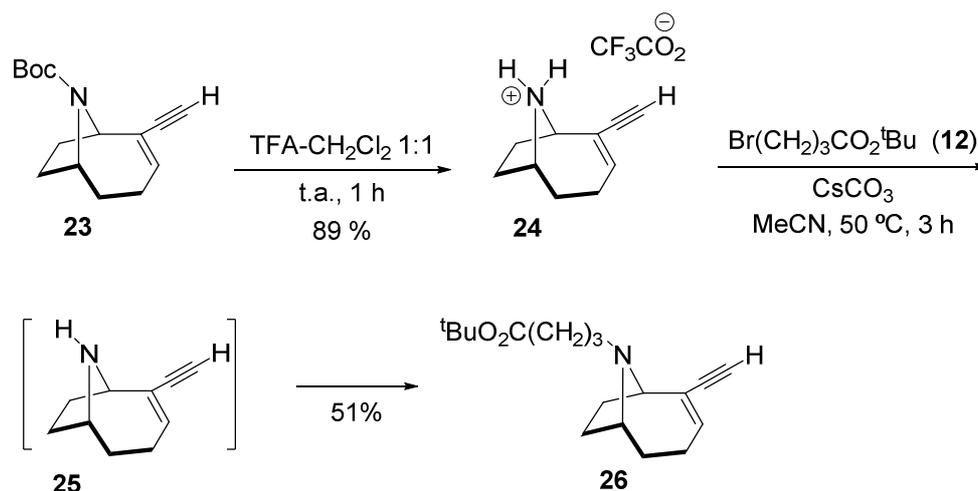
---

cadena lateral incorporada, así como la presencia en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace ( $\delta$  105.6 y 92.6 ppm).

La introducción del grupo etinilo se completó mediante una reacción de desililación del alquino **22**; para ello, aplicamos un proceso de desililación alcalina empleando una disolución metanólica de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .<sup>178</sup> La reacción de desililación transcurre suavemente para proporcionar después de una hora de agitación a temperatura ambiente el enino conjugado **23** con un excelente rendimiento. El proceso de desililación se confirma fácilmente en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **23**, en el que no se observa el singlete de los metilos del grupo trimetilsililo y sí un nuevo singlete que integra a un protón a  $\delta$  2.89 ppm, asignable al protón del alquino terminal.

Siguiendo con la estrategia prevista, y con vistas a la incorporación de la cadena carboxilada sobre el átomo de nitrógeno, se procedió a continuación con la hidrólisis de grupo *N*-Boc. En este sentido, y tal como se recoge en el **Esquema 3.12**, la hidrólisis del grupo *N*-Boc en **23** se realizó por tratamiento con una mezcla equimolecular de TFA y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente durante 1 h, unas condiciones ácidas muy suaves, quimioselectivas para la desprotección de este tipo de carbamatos, en las que inicialmente se forma un ácido carbámico que espontáneamente se descompone en el medio de reacción liberando la amina y  $\text{CO}_2$ . El procesado de la reacción es muy sencillo, simplemente se elimina a vacío el disolvente y el exceso de ácido, y proporcionó el producto de hidrólisis como la sal de amonio con el ácido trifluoroacético, el compuesto **24**.

Tras confirmar por RMN de  $^1\text{H}$  la ausencia de la señal característica del grupo *tert*-butilo de la agrupación *Boc* y sin purificación posterior, se llevó a este producto a la reacción de *N*-alquilación con el 4-bromobutanoato de *tert*-butilo (**12**) en condiciones similares a las utilizadas previamente para la reacción análoga de *N*-alquilación del compuesto **11** (ver **Esquema 3.5**). En este caso la reacción de alquilación, que en el medio básico utilizado transcurre a través de la amina libre **25**, es sensiblemente más rápida, obteniéndose después de 3 h de reacción el compuesto *N*-alquilado **26** con un rendimiento del 51% (ver **Esquema 3.12**).



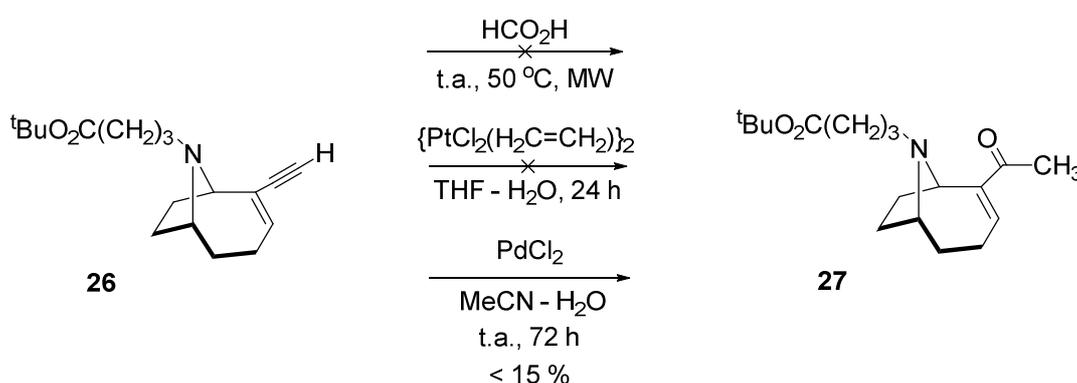
**Esquema 3.12.** Introducción de la cadena carboxilada sobre el nitrógeno puente

Con intención de mejorar el rendimiento obtenido, se llevaron a cabo diferentes modificaciones de algunas de las variables experimentales del proceso de alquilación (base, tiempo de reacción, disolvente, proporción molar de reactivos, etc.), pero ninguna de las modificaciones ensayadas logró mejorar el rendimiento de las condiciones iniciales. Tampoco el uso de un catalizador como el NaI en DMF, que cataliza el proceso de alquilación a través de la conversión del bromuro alquilante en el más electrofílico yoduro vía una reacción de Finkelstein,<sup>179,180</sup> condujo a mejores resultados.

Una vez incorporada la cadena carboxilada en la posición nitrogenada del sistema bicíclico, se estaba en condiciones de completar la formación del grupo acilo a través de la hidratación del triple enlace de **26**, una transformación que no resultó tan sencilla de efectuar como se había pensado inicialmente. Así, ni el tratamiento con ácido fórmico, que debería conducir al producto de hidratación a través del correspondiente enol formiato,<sup>181</sup> ni el uso del dímero de Zeise en THF-H<sub>2</sub>O, un catalizador de PtCl<sub>2</sub> descrito para la hidratación tanto de alquinos terminales como internos,<sup>182</sup> condujeron a la metilcetona resultante del proceso de hidratación del triple enlace. Solamente la utilización de PdCl<sub>2</sub> como catalizador en MeCN con cantidades catalíticas de agua y dejando avanzar la reacción durante 72 h a temperatura ambiente condujo al producto de hidratación,<sup>173</sup> la cetona

conjugada, aunque con un rendimiento muy bajo que no superó en ninguno de los ensayos realizados el 15% (**Esquema 3.13**).

Aunque para fines prácticos estas condiciones de hidratación no resultan interesantes, la obtención de la enona  $\alpha,\beta$ -insaturada **27** permitió caracterizar este compuesto por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y algunos estudios espectroscópicos bidimensionales. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa un claro desapantallamiento del protón olefínico a  $\delta$  6.90 ppm, característico de protones olefínicos de sistemas carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, mientras que en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observan las señales correspondientes a los carbonos del doble enlace, a  $\delta$  149 y 143 ppm, y del grupo carbonilo a  $\delta$  199.1 ppm, desplazamientos también característicos de una agrupación de este tipo.



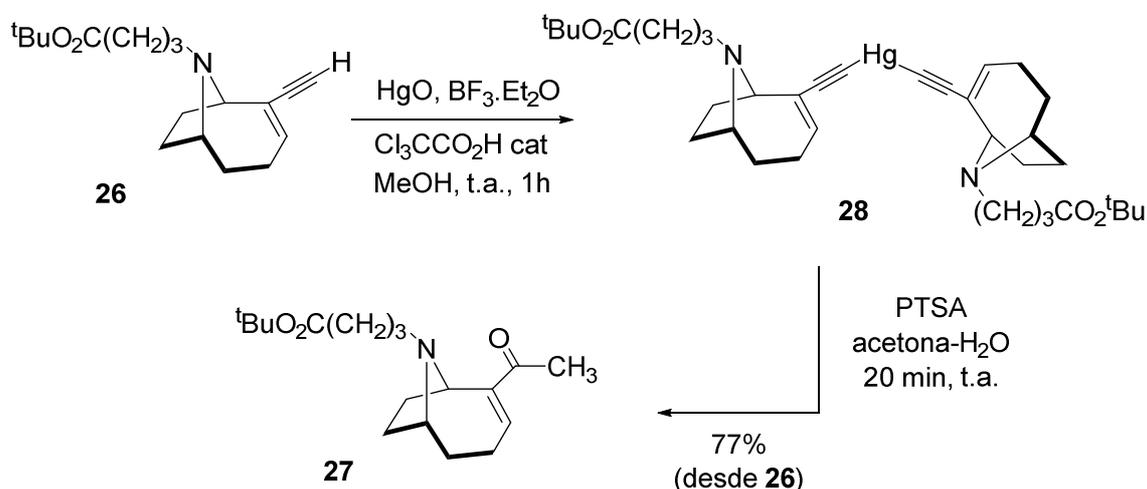
**Esquema 3.13.** Intentos de hidratación del triple enlace de **26**

Finalmente, la obtención de la enona  $\alpha,\beta$ -insaturada **27** se consiguió con un rendimiento satisfactorio y reproducible cuando el derivado acetilénico **26** se trató con una disolución metanólica de óxido de mercurio (II) y trifluoruro de boro dietil-eterato ( $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ ) en presencia de cantidades catalíticas de ácido tricloroacético (0.2 equivalentes respecto al  $\text{HgO}$ ).<sup>183,184</sup> Bajo estas condiciones de reacción, el producto mayoritario aislado no fue inicialmente el producto de hidratación deseado, sino, según indicaron los datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas, el complejo mercuríco *bis*-acetilénico **28**, que resultó ser relativamente estable (**Esquema 3.14**).<sup>xii</sup> No obstante, cuando el complejo

<sup>xii</sup> Este producto fue completamente estable almacenado a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante al menos 1 mes.

organomercúrico inicialmente formado se trató con ácido *p*-toluensulfónico en acetona acuosa durante 20 minutos a temperatura ambiente,<sup>185,186</sup> se obtuvo, después de la purificación del crudo de reacción por cromatografía, el producto de hidratación deseado **27** con un rendimiento global del 77%.

El aislamiento del complejo organomercúrico como intermedio en las condiciones de hidratación del triple enlace de **26** fue un tanto inesperado. Se ha propuesto que la reacción de hidratación con el catalizador de Hennion-Nieuwland ( $\text{HgO} \cdot \text{BF}_3$ ), en condiciones semejantes a las utilizadas, sigue un curso mecanístico que, en principio, implica la formación de un complejo  $\pi$ -mercúrico de carácter electrofílico que facilita la adición a la insaturación de nucleófilos suaves (como el metanol, acetato, tricloacetato, etc.), conduciendo a la formación de un acetal o enol-éter, los cuales se hidrolizan en el propio medio de reacción o durante el procesado de la misma al correspondiente compuesto carbonílico.<sup>182</sup> En principio, los ejemplos descritos en la literatura de formación de complejos de tipo *bis*(alquínil) mercurio, como el aislado en este caso, suelen implicar la reacción de los alquinos terminales con sales de Hg(II) en medio alcohólico básico.<sup>182,187,188,189</sup>



Esquema 3.14. Transformación del alquino **26** en la metilcetona **27**

Una vez se dispuso del éster *tert*-butílico **27**, la síntesis del hapteno ANn se completó fácilmente mediante la hidrólisis ácida del grupo éster *tert*-butílico. La reacción se llevó a cabo en condiciones ácidas suaves empleando una mezcla equimolecular de TFA y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , completándose a temperatura ambiente en sólo 1 h,

---

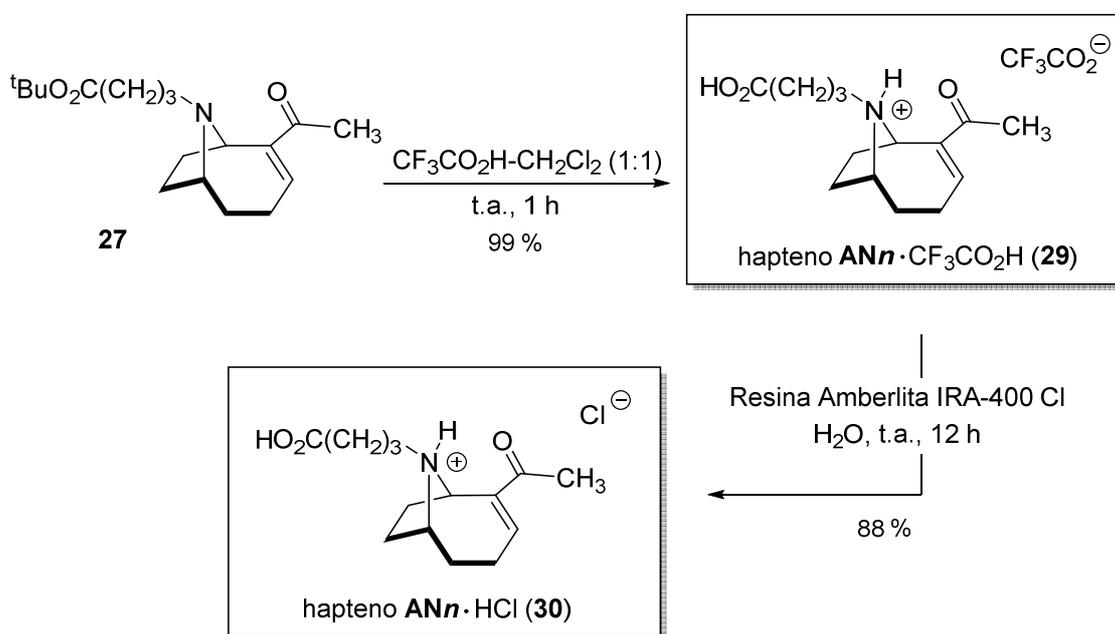
para proporcionar, después de la eliminación a vacío del disolvente y del exceso de ácido, el hapteno AN $n$  como sal de amonio del ácido trifluoroacético (**29**) con un rendimiento prácticamente cuantitativo (**Esquema 3.15**). La obtención del hapteno AN $n$  como sal con el ácido trifluoroacético se confirmó en base a sus datos espectroscópicos, particularmente por el desapantallamiento del grupo metileno de la cadena carboxilada contiguo al átomo de nitrógeno, que pasa de  $\delta$  2.41 ppm en el éster **27** a  $\delta$  3.16 ppm, y la señal del grupo CF<sub>3</sub> del anión trifluoroacetato, que se observa en el espectro de RMN de <sup>19</sup>F desacoplado como un singlete a  $\delta$  -77.73 ppm.

Ante la dificultad que podría suponer desde el punto de vista experimental la transformación de la sal del hapteno AN $n$  con el ácido trifluoroacético en el hapteno libre, en forma de amino-ácido, se decidió mantener el hapteno en forma de sal de amonio. Esto no representa ningún inconveniente, puesto que la siguiente transformación, que implica la activación del grupo carboxilato como éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, se lleva a cabo en medio básico, en el cual se neutraliza el grupo amonio. Lo que sí que se llevó a cabo fue el intercambio del anión trifluoroacetato por cloruro, para prever cualquier tipo de interferencia que este grupo carboxilato pudiera plantear durante el proceso de activación del grupo carboxilato del hapteno. El intercambio del contraión de la sal de amonio del hapteno se realizó de forma simple y eficaz utilizando una resina de intercambio iónico, en particular, la resina Amberlita™ IRA-400 en la forma de cloruro (**Esquema 3.15**).<sup>190</sup>

El proceso de intercambio aniónico se realizó agitando una suspensión acuosa de la resina, previamente acondicionada,<sup>191,192,193</sup> y el trifluoroacetato del hapteno (**29**) en agua a temperatura ambiente durante toda la noche, seguido de filtración para separar la resina y liofilización del filtrado, lo que proporcionó directamente, con un rendimiento elevado, el clorhidrato del hapteno AN $n$  (**30**) como un sólido espumoso muy higroscópico y prácticamente puro. El intercambio del anión trifluoroacetato por cloruro se confirmó inequívocamente del análisis de los datos espectroscópicos del clorhidrato, cuyos espectros de RMN (realizados en D<sub>2</sub>O) eran

equivalentes a los del trifluoroacetato precursor **29**, a excepción de la ausencia en los espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^{19}\text{F}$  del primero de las señales correspondientes al grupo trifluoroacetato.

Globalmente considerada, la síntesis del hapteno  $\text{AN}_n$  descrita en los párrafos previos a partir del producto comercial 9-oxabicyclo[6.1.0]non-4-eno (**7**) implica 11 etapas sintéticas, las cuales transcurren con un rendimiento global del 16%. Un esquema completo con todas ellas se incluye en el apartado de resumen y conclusiones (ver página **124**).



Esquema 3.15. Última etapa de la síntesis del hapteno  $\text{AN}_n$  como sal de amonio

### 3.2.2.3 Síntesis del hapteno $\text{AN}_m$

Estructuralmente, el hapteno  $\text{AN}_m$  mantiene íntegramente el esqueleto aza-bicíclico de anatoxina-a, incorporando el brazo espaciador, una cadena hidrocarbonada carboxilada de cuatro átomos de carbono, como una homologación del metilo de la agrupación metilcarbonilo en C-2 (ver **Figura 3.9**).

La ruta sintética utilizada para la preparación de este hapteno se basa en la misma estrategia desarrollada previamente para la preparación del hapteno  $\text{AN}_n$  y que ha sido descrita en el apartado precedente. De hecho, se parte de un intermedio avanzado de la misma, el enol triflato **20**, a partir del cual se incorpora

el brazo espaciador vía una reacción de acoplamiento cruzado tipo Sonogashira, elaborándose la agrupación carbonílica insaturada también a través de una hidratación regioselectiva del triple enlace (Figura 3.9).

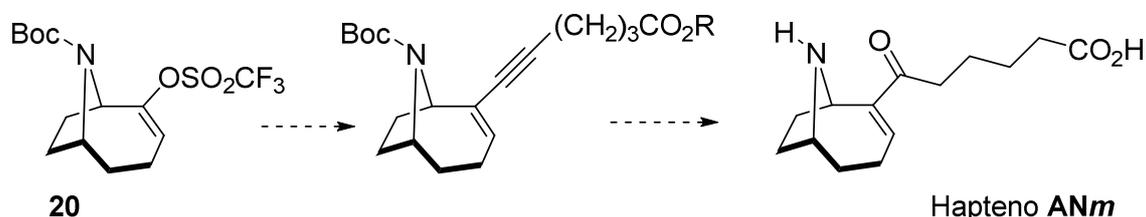
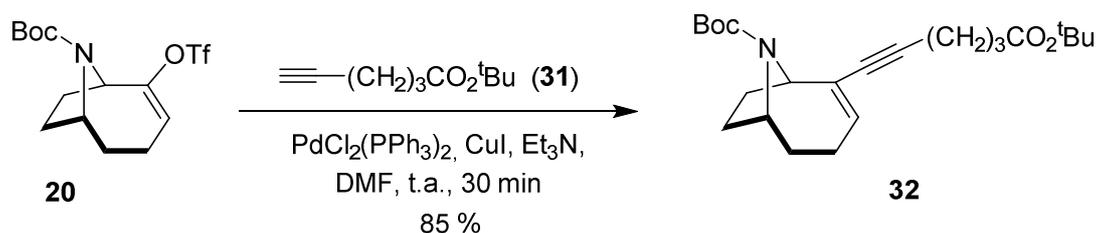


Figura 3.9. Estrategia sintética para la preparación del hapteno ANm

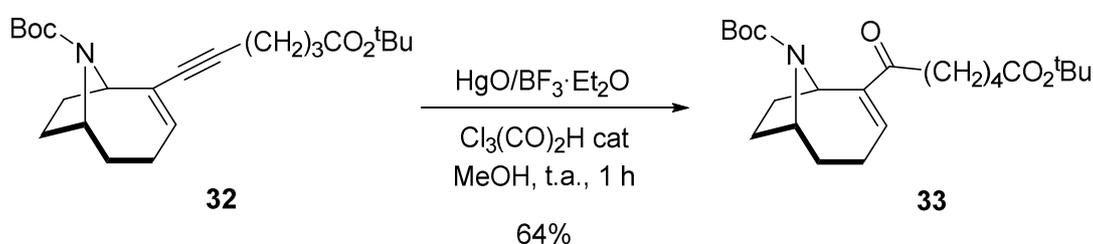
Como se acaba de comentar, la síntesis del hapteno ANm se inició a partir del enol triflato **20**, a través del cual se introdujo la cadena del hex-5-inoato de *tert*-butilo (**31**)<sup>xiii</sup> aplicando la química de acoplamiento mediada por Pd(0) descrita previamente (Esquema 3.16). Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, procesamiento de reacción y purificación cromatográfica, se obtuvo el enino conjugado **32** con un rendimiento del 85%. En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **32** destaca el desplazamiento observado a campos más bajos de la señal olefínica en relación al triflato de partida ( $\delta$  5.94 vs 5.75 ppm) y, particularmente, la presencia en el espectro de RMN de <sup>13</sup>C de las señales correspondientes a los carbonos del triple enlace,  $\delta$  87.4 y 82.6 ppm, y resto de carbonos de la cadena alquínica incorporada.



Esquema 3.16. Reacción de acoplamiento cruzado del triflato **20** con el alquino terminal **31**

<sup>xiii</sup> El éster *tert*-butílico **31**, utilizado para la incorporación del brazo espaciador de este hapteno, se preparó a partir del ácido 5-hexinoico utilizando el mismo procedimiento de esterificación descrito con anterioridad para la preparación del éster **12** (ver parte experimental).

La hidratación del triple enlace del alquino **32** se realizó también utilizando las condiciones catalíticas de Hennion–Nieuwland con la mezcla  $\text{HgO-BF}_3$  y  $\text{Cl}_3\text{CCO}_2\text{H}$  en  $\text{MeOH}$  a temperatura ambiente, obteniéndose en ese caso directamente la cetona conjugada **33** con un rendimiento del 64% (**Esquema 3.17**). La formación del sistema cetónico  $\alpha,\beta$ -insaturado en **33** quedó de manifiesto por el claro desapantallamiento que se observa en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del protón olefínico, que aparece a  $\delta$  6.80 ppm, característico de este tipo de sistemas conjugados, además de las señales de RMN de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  150 y 141 ppm, correspondientes a los carbonos del doble enlace, y a  $\delta$  199.7 ppm, correspondiente al grupo carbonilo conjugado.



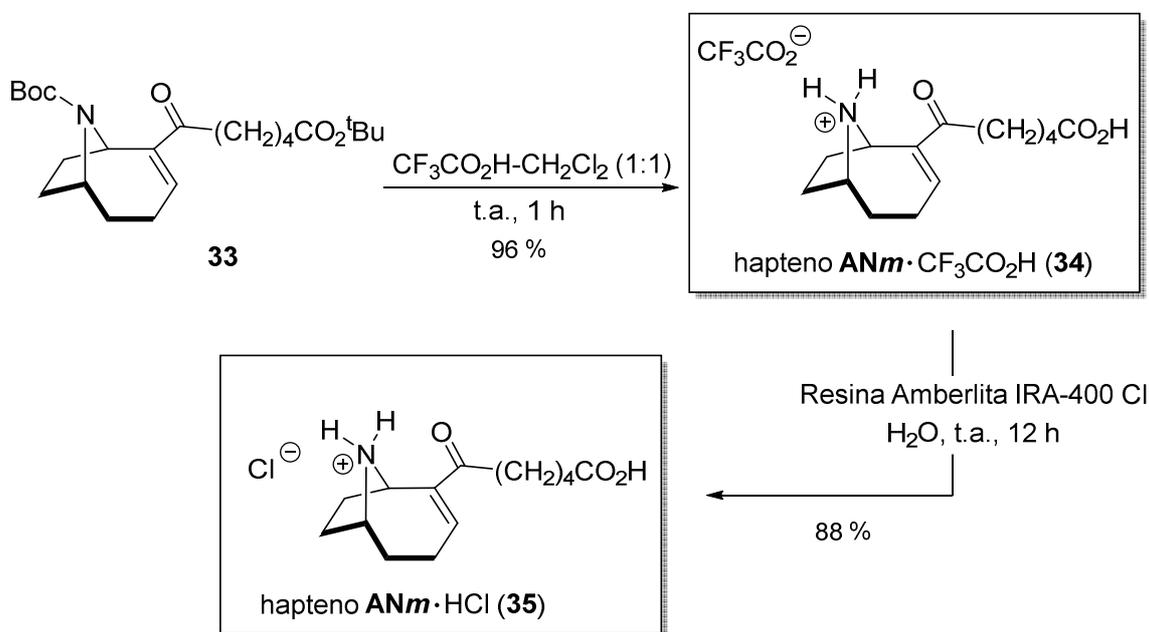
**Esquema 3.17.** Hidratación del triple enlace del alquino **32**

Una vez completada la incorporación del brazo espaciador, la síntesis del hapteno  $\text{AN}_m$  se completó mediante la hidrólisis simultánea de los grupos *tert*-butil éster y *N*-Boc de **33**. Esta doble hidrólisis se llevó a cabo también utilizando una mezcla equimolecular de TFA y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a temperatura ambiente, que en sólo una hora produjo la hidrólisis completa de ambos grupos funcionales para proporcionar directamente la sal con el ácido trifluoroacético del hapteno  $\text{AN}_m$  (**34**) (**Esquema 3.18**).

Al igual que se ha indicado anteriormente en el caso del hapteno  $\text{AN}_n$ , la formación del trifluoroacetato **34** se manifiesta claramente en los espectros de RMN del mismo, siendo particularmente relevante el espectro de  $^{19}\text{F}$ , en el que se observa una única señal como singlete a  $\delta$  -76.8 ppm correspondiente al  $\text{CF}_3$  de la agrupación trifluoroacetato.

La doble reacción de hidrólisis se llevó a cabo también utilizando ácido fórmico como catalizador y disolvente del proceso hidrolítico; la reacción de hidrólisis con

este ácido, aunque igual de eficaz, transcurrió bastante más lentamente, requiriendo 4 h a temperatura ambiente para la completa transformación de **33** en el correspondiente formiato del hapteno AN*m*.



**Esquema 3.18.** Última etapa de la síntesis del hapteno AN*m* como sal de amonio

También en este caso se optó por mantener el hapteno AN*m* en forma de sal de amonio, en particular como clorhidrato. Tanto el trifluoroacetato como el formiato del hapteno AN*m* se transformaron fácilmente al correspondiente clorhidrato (**35**) mediante un intercambio del anión, trifluoroacetato o formiato, por cloruro, utilizando la resina Amberlita™ IRA-400 en forma de cloruro (ver página 152 de apartado experimental).

En resumen, la síntesis del hapteno AN*m* en forma de sal de amonio se completó a partir del vinil triflato **20**, intermedio común de la síntesis del hapteno AN*n*, en tres etapas sintéticas con un rendimiento del 52%, lo que representa un rendimiento global del 25% para las ocho etapas que implica su preparación desde el producto comercial 9-oxabicyclo[6.1.0]non-4-eno (**7**). Un esquema completo de la preparación de este hapteno según la estrategia que se acaba de describir se recoge en el apartado de resumen y conclusiones (ver página 125).

### 3.2.2.4 Síntesis del hapteno ANc

El hapteno ANc puede considerarse como un derivado oximínico de la anatoxina-a y que, formalmente, correspondería al producto de condensación de ésta con el ácido (aminooxi)acético (ver **Figura 3.10**). Agrupaciones aminoxialquilcarboxílicas de cadena corta, como la de este hapteno, o de mayor tamaño, han sido previamente utilizadas para la preparación de conjugados proteicos inmunizantes cuando la molécula a conjugar posee en su estructura un grupo carbonilo aldehídico o cetónico.<sup>194,195,196</sup> Ya se ha comentado al principio de esta sección que el diseño de este hapteno pretendía reducir la reactividad de la agrupación insaturada carbonílica frente a adiciones nucleofílicas, tanto de tipo Michael sobre el carbono  $\beta$  del doble enlace como sobre el propio grupo carbonilo, que podrían producirse *in vivo* durante el proceso de inmunización, por ejemplo de grupos SH como los del glutatión o  $\text{NH}_2$  de las propias proteínas, y que modificarían sustancialmente la estructura del inmunógeno. Existen algunos precedentes en la literatura que avalarían este supuesto; por ejemplo, Nilsson y cols.<sup>197</sup> han descrito que la carvona, que puede considerarse como modelo de una funcionalización cetónica  $\alpha,\beta$ -insaturada similar a la de anatoxina-a, experimenta inmediatamente una adición conjugada tipo Michael de tiofenol ( $\text{PhSH}$ ) y reacciona, aunque mucho más lentamente, con bencilamina ( $\text{PhCH}_2\text{NH}_2$ ) a través del carbonilo para formar la correspondiente base de Schiff. En cambio, el correspondiente derivado oximínico experimenta muy lentamente la adición de Michael de tiofenol, que solo va desplazándose (15% tras cuatro días) por la oxidación que se produce del sulfuro inicialmente formado a sulfóxido, y es totalmente inerte frente a la adición de bencilamina.

La síntesis del hapteno ANc también aprovecha uno de los intermedios de la síntesis del hapteno ANn preparado previamente. En particular, la síntesis parte del enino conjugado **23**, utilizándose el triple enlace para la generación del grupo metil carbonilo, vía hidratación del mismo, e incorporándose posteriormente el resto aminoxiacético a través de una condensación de la alcoxiamina adecuada con el grupo carbonílico cetónico (**Figura 3.10**).

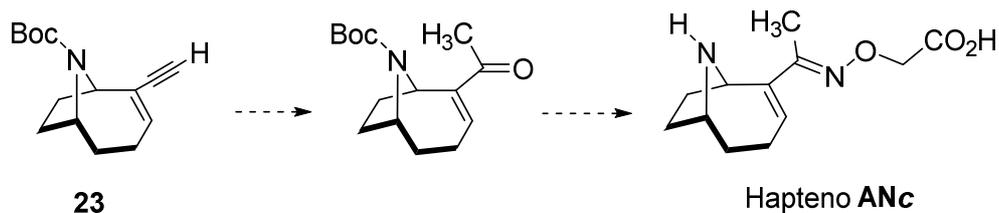


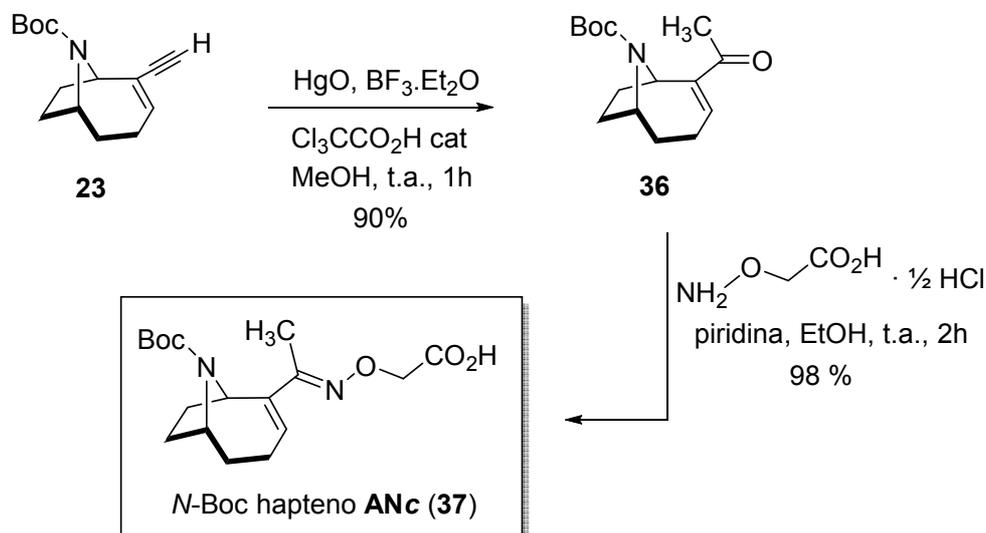
Figura 3.10. Estrategia sintética para la preparación del hapteno ANc

La reacción de hidratación del triple enlace de **23** se llevó a cabo en condiciones semejantes a las utilizadas en los casos previos relacionados, vía catálisis con el sistema  $\text{HgO-BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}/\text{Cl}_3\text{CCO}_2\text{H}$  en metanol (Esquema 3.19). La reacción de hidratación proporcionó, en este caso directamente tras tratar la mezcla de reacción con agua y agitar la mezcla resultante durante unos minutos, el producto de hidratación, la *N*-Boc anatoxina-a (**36**) con un rendimiento excelente. Dicho producto fue caracterizado por sus propiedades espectroscópicas, que resultaron coincidentes con las descritas en la literatura para el mismo.<sup>198</sup> La *N*-Boc anatoxina-a (**36**) ha sido obtenida previamente como intermedio de diversas síntesis de anatoxina-a, aunque a través de otras rutas sintéticas menos eficientes que la descrita en este trabajo.<sup>80,81,199,200</sup>

El tratamiento de **36** con un exceso del hemihidrocloruro del ácido amino-oxiacético y piridina en EtOH a temperatura ambiente durante 2 h condujo a la formación de la correspondiente *O*-alquinoxima **37** con un rendimiento prácticamente cuantitativo (Esquema 3.19). La formación del derivado oximínico **37** se confirmó del análisis de sus datos espectroscópicos, cuyos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mostraban las señales propias tanto del sistema azabíclico de la anatoxina-a como del brazo espaciador oximínico incorporado, en particular, el sistema AB característico de los protones diastereotópicos del grupo  $\text{OCH}_2$  a  $\delta$  4.66, la señal de cuyo átomo de carbono también se observa en el espectro de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  68.6 ppm, y la señal correspondiente al carbonilo del grupo carboxilato que aparece en el espectro de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  172.9 ppm.

Aunque el hapteno ANc era en principio fácilmente obtenible a partir del derivado oximínico **37** vía la hidrólisis ácida del grupo *N*-Boc, tal como se había realizado anteriormente para los haptenos ANn y ANm, en este caso se decidió, en base a

diversos estudios previos que así lo aconsejaban, no realizar en este punto esta hidrólisis sino dejarla para después de la activación del grupo carboxilato como éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, un aspecto que se discute en un apartado posterior.



Esquema 3.19. Preparación del derivado *N*-Boc del hapteno ANc

Globalmente, la síntesis del hapteno ANc, en forma del derivado *N*-Boc, desde el epóxido comercial 7 implica un total de 9 etapas que se llevan a cabo con un rendimiento global del 38%. Como para los demás haptenos, el conjunto de etapas que constituyen su preparación se recogen agrupadas en un esquema general en el apartado de resumen y conclusiones.

### 3.2.3 Preparación de bioconjugados de los haptenos AN<sub>n</sub>, AN<sub>m</sub> y ANc

#### 3.2.3.1 Activación de los haptenos: formación de los ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo

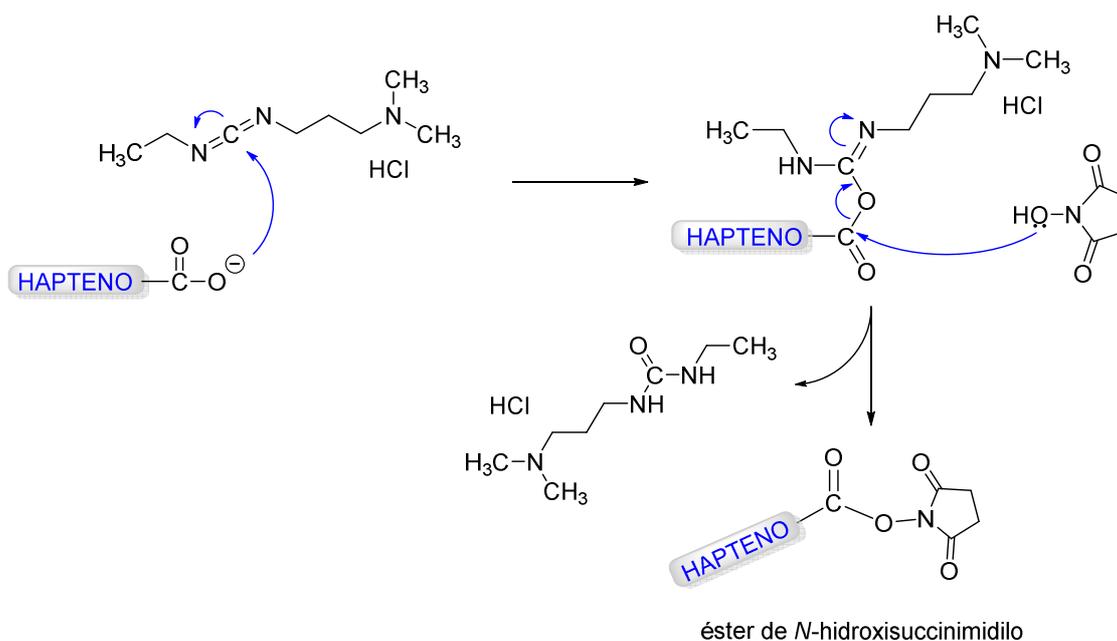
Una vez preparados los haptenos AN<sub>n</sub>, AN<sub>m</sub> y ANc, y previamente a su conjugación con proteínas y/o enzimas, fue necesaria la activación del grupo carboxilo terminal presente en todos ellos, activación que se llevó a cabo a través de lo que se conoce como método del éster activo.<sup>201</sup> Los procedimientos más ampliamente utilizados con esta finalidad implican la utilización de un agente de activación, generalmente una carbodiimida como *N,N*'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), o clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC·HCl), una carbodiimida soluble en agua, en combinación con la *N*-hidroxisuccinimida (NHS),

sulfo-NHS, o un derivado hidroxitriazólico como 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt).

Una de las combinaciones que mejores resultados proporciona en el proceso de activación de grupos carboxilo es la EDC·HCl utilizada con NHS en diclorometano como disolvente. Mecánicamente, la reacción de activación implica la reacción inicial del grupo carboxilato con la agrupación diimida de la carbodiimida, generándose la correspondiente *O*-acilisourea, que es atacada *in situ* por el hidroxilo de la NHS para formar el éster de *N*-hidroxisuccimidilo y la urea asimétrica hidrosoluble (**Figura 3.11**).

La ventaja principal de usar el clorhidrato de EDC es la naturaleza hidrosoluble tanto del reactivo como de la urea residual que se genera, lo que permite eliminarlos por lavados con agua una vez finalizada la reacción de activación. La hidrólisis del clorhidrato de EDC es ampliamente pH dependiente, por lo que el control de este factor es importante en el proceso de activación en medio alcalino.<sup>202,203</sup>

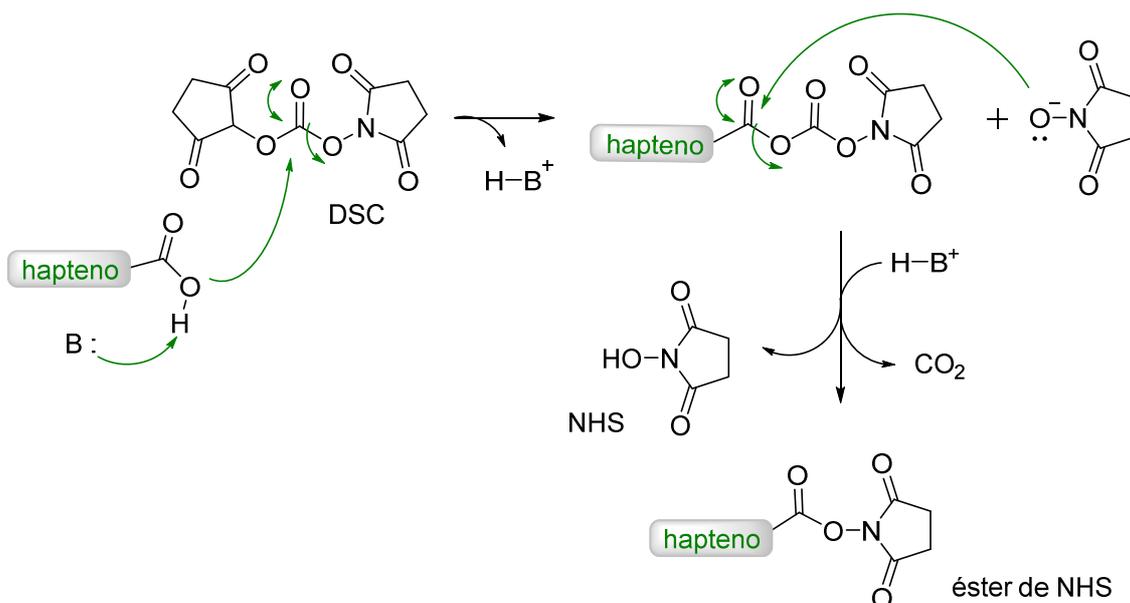
El procedimiento basado en la utilización de la DCC con NHS en DMF es otro procedimiento común para activar el grupo carboxílico de un hapteno. La principal desventaja de este método es que la urea formada precipita en el medio de reacción, y aunque puede eliminarse por centrifugación, hacerlo completamente es difícil, razón por la cual habitualmente el éster activo, sin previa purificación, se lleva directamente a la etapa de conjugación, con el riesgo implícito de promover bajo esas condiciones reacciones de entrecruzamiento en la proteína.<sup>137</sup>



**Figura 3.11.** Mecanismo de formación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo

Un procedimiento alternativo para la formación de los ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo, que no implica la formación de una urea como subproducto, es el descrito inicialmente por Ogura y colaboradores<sup>204</sup> que emplea carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (DSC) y trietilamina en acetonitrilo, que únicamente genera como subproductos CO<sub>2</sub> y NHS, la cual es hidrosoluble y por ello fácil de eliminar por extracción líquido-líquido durante el procesado de las reacciones (**Figura 3.12**).

Los ensayos de activación del grupo carboxilo de los haptenos AN $n$  y AN $m$  como sales de trifluoroacetato o clorhidrato, preparados como se ha visto en el apartado previo, empleando diferentes procedimientos de activación basados en la utilización de NHS o HOBt y una carbodiimida, o DSC-Et<sub>3</sub>N, no condujeron a los resultados esperados. Un resultado análogo se obtuvo con un procedimiento alternativo basado en la utilización de tetrafluoroborato de *N,N,N,N*-tetrametil-*O*-(*N*-succinidil)uronio) (TSTU).

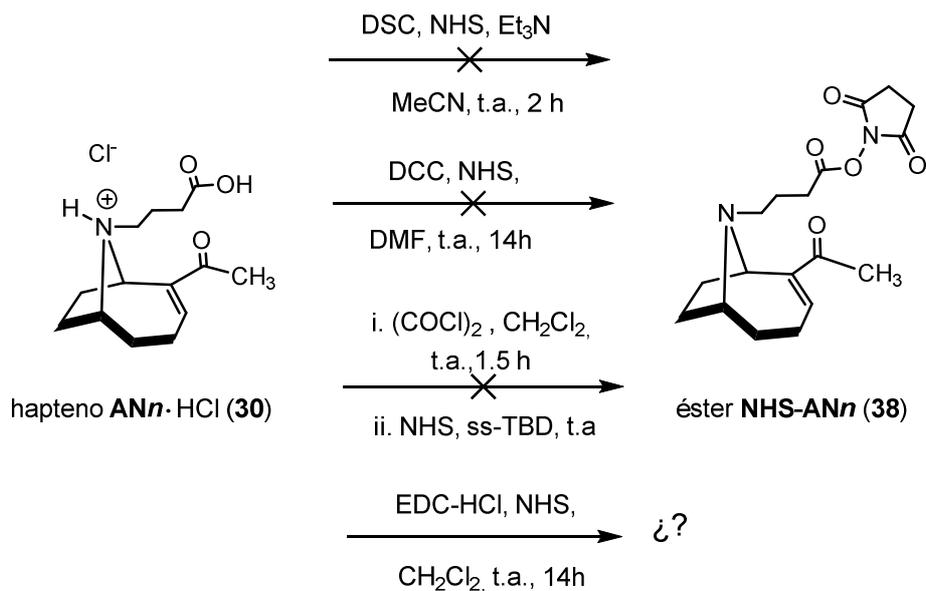


**Figura 3.12.** Formación del éster activo basado en la utilización de DSC

Otro método alternativo de activación<sup>205</sup> del grupo carboxílico basado en la formación inicial del cloruro de ácido, por tratamiento con cloruro de oxalilo, seguido de reacción con NHS en presencia de una resina de carácter básico moderado, 1,3,4,6,7,8-hexahidro-2H-pirimidina polimérica (ss-TBD), tampoco proporcionó el éster activo deseado (**Esquema 3.20**). En la mayoría de estas condiciones se observaba por cromatografía en capa fina una mezcla compleja de subproductos de reacción, con la aparente ausencia de formación de un producto mayoritario.

Aparentemente, y sólo para el hapteno AN<sub>n</sub>, sí que parecía producirse la reacción de activación por tratamiento con EDC·HCl y NHS en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a temperatura ambiente (20-25 °C); en esas condiciones, en la mezcla de reacción se apreció por CCF la formación de un producto mayoritario atribuible, en base a su polaridad, al éster activo.<sup>xiv</sup> Sin embargo, todos los intentos de aislarlo del medio de reacción y purificarlo por cromatografía condujeron a la completa pérdida del material formado.

<sup>xiv</sup> Desafortunadamente, la formación del éster activo no pudo confirmarse en este punto de modo concluyente a partir de los datos de RMN del crudo de reacción, debido a la presencia en el mismo del exceso de los reactivos de partida utilizados, lo que dificultó su análisis.

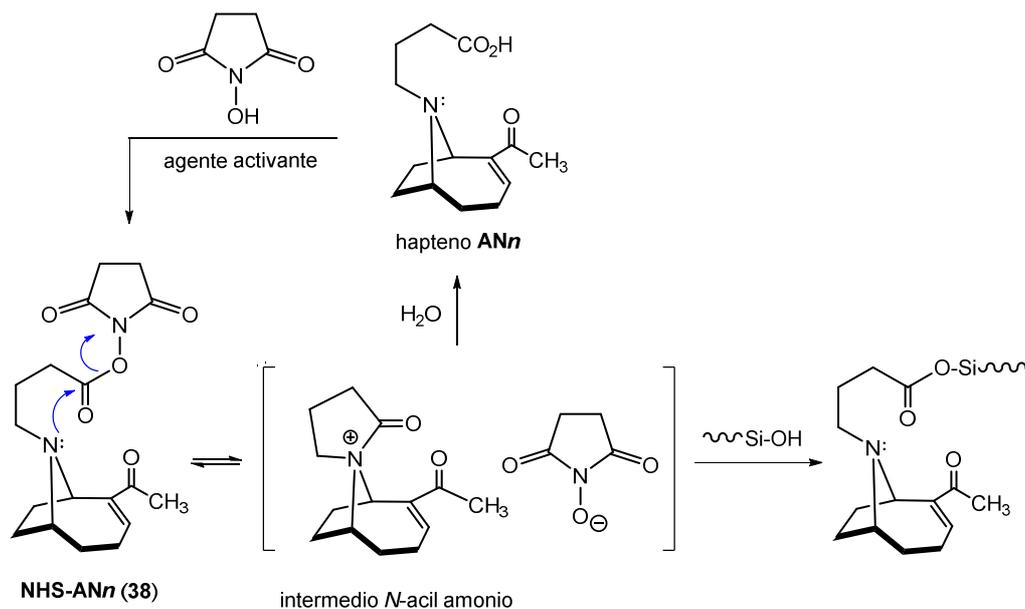


**Esquema 3.20.** Algunos intentos de activación del hapteno **ANn**

Las dificultades encontradas para la activación del grupo carboxílico del hapteno **ANn** y/o posterior aislamiento del éster activo contrastan con los numerosos ejemplos que se encuentran descritos en la literatura de activación de grupos carboxílicos de este tipo en presencia de grupos amino.<sup>124,206,207,208</sup> Una posible explicación a este hecho podría encontrarse en la reactividad del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo que puede formarse, el cual podría ser especialmente susceptible a experimentar reacciones con nucleófilos, como, por ejemplo, el agua durante el procesado de las reacciones de activación o la propia sílice durante los intentos de purificación cromatográfica. Esta especial reactividad estaría motivada por la posibilidad de una catálisis del grupo amino puente, un centro nitrogenado especialmente básico y nucleofílico, que podría participar en un proceso intramolecular conduciendo a un intermedio de tipo *N*-acil amonio, análogo al que se produce en los procesos de acilación catalizados por aminas,<sup>209,210,211</sup> que sería la especie intermedia reactiva que reaccionaría con los potenciales nucleófilos (**Figura 3.13**).

Ante esta eventualidad, y dadas las dificultades que encontramos para el aislamiento y caracterización del éster activo del hapteno **ANn** (**38**), se decidió proceder directamente a la conjugación proteica del hapteno **ANn** con el crudo obtenido de la reacción de activación del clorhidrato **30** con EDC·HCl/NHS,

condiciones en las que aparentemente tiene lugar la formación del correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo. Lógicamente, esta forma de proceder impide la correcta caracterización del éster activo previamente a la conjugación, por lo que la formación del mismo y su apropiada conjugación a las diferentes proteínas tan sólo podría confirmarse mediante la adecuada caracterización de los conjugados proteicos obtenidos por MALDI-TOF-MS (ver más adelante).



**Figura 3.13.** Propuesta de reactividad del éster activo del hapteno **ANn** (38) con nucleófilos

Tampoco en el caso del hapteno **ANm**, ya sea como trifluoroacetato (34) o como cloruro (35), fue posible aislar el correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo en las diferentes condiciones ensayadas, un resultado que también se atribuyó a la presencia en el hapteno del nitrógeno puente que potencialmente estaría actuando, en este caso intermolecularmente, como catalizador básico y/o nucleofílico en los procesos de hidrólisis de la agrupación del éster activo. En este sentido, ya en 2009 Franck y cols. mencionan la necesidad de buscar procedimientos de conjugación para anatoxina-a no basados en la utilización de un éster activo, debido a la presencia en la misma del grupo amino reactivo.<sup>65</sup>

Este resultado nos hizo replantearnos la estrategia seguida para la preparación del éster activo del hapteno **ANm** y se decidió desarrollar un procedimiento

alternativo basado en su formación antes de la liberación del grupo amino del sistema azabíclico, una estrategia en la que el átomo de nitrógeno se mantiene como derivado *N*-Boc a lo largo de toda la secuencia sintética, liberándose en la última etapa, en presencia del éster activo, en forma de sal de amonio (Figura 3.14).

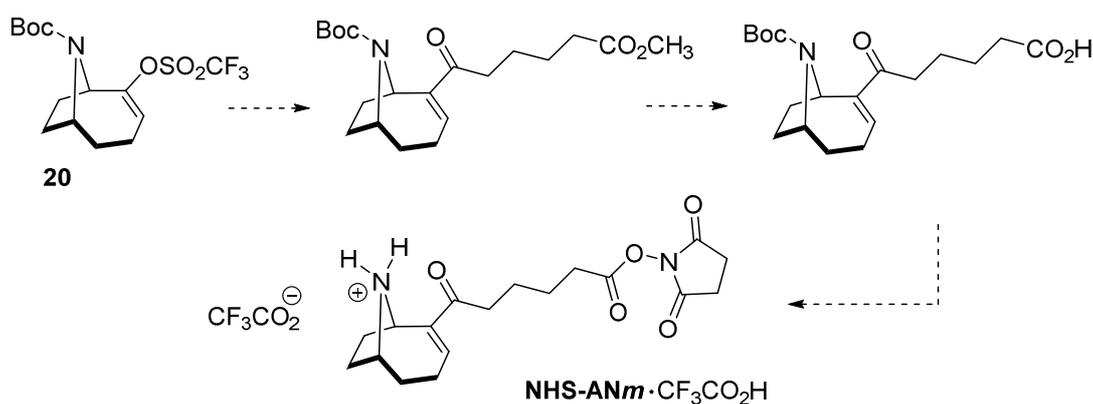
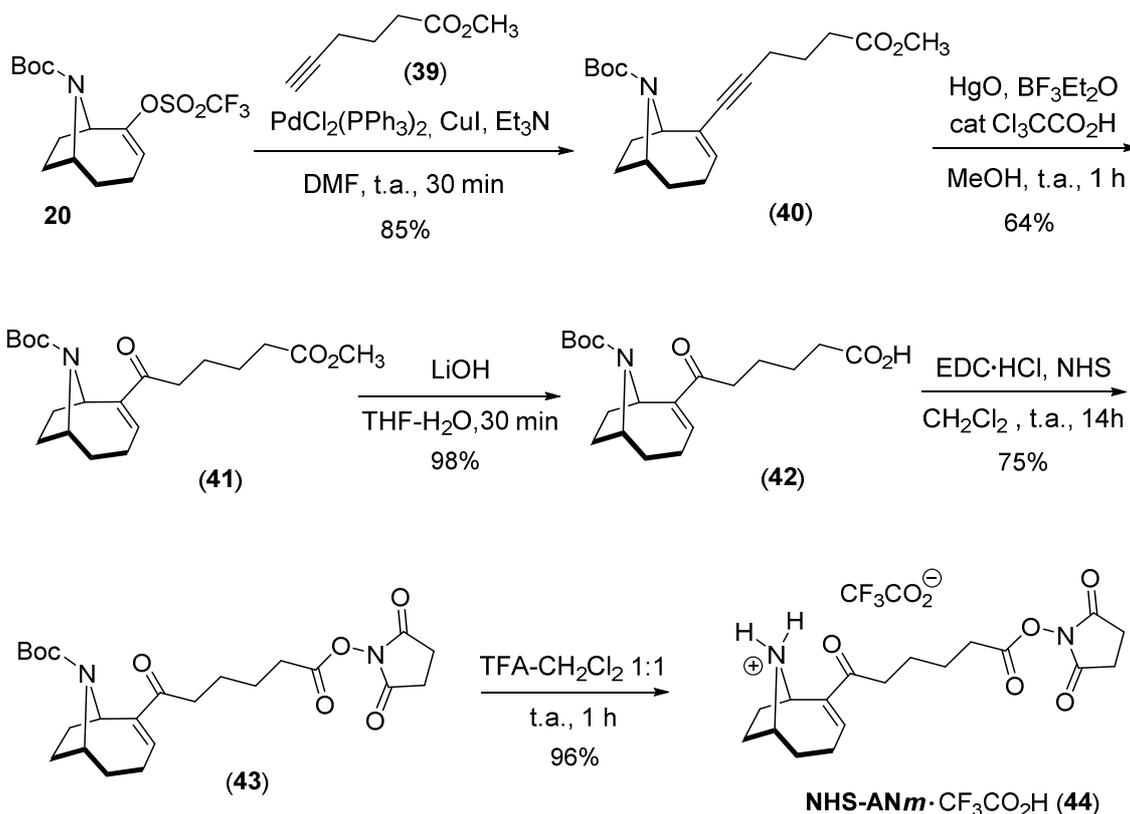


Figura 3.14. Propuesta alternativa para la preparación del éster activo del hapteno ANm

En esta nueva aproximación sintética se sigue básicamente la misma estrategia desarrollada para la preparación del trifluoroacetato del hapteno ANm (**34**), comentada en el apartado 3.2.2.3. En la misma se parte también del enol triflato **20**, a partir del cual se incorpora la función carbonílica insaturada y el brazo espaciador. La diferencia fundamental reside en el tipo de éster incorporado como parte del brazo espaciador; en este caso se utilizó un éster metílico, en lugar del *tert*-butílico utilizado previamente, al objeto de poder llevar a cabo su hidrólisis al correspondiente ácido carboxílico en condiciones compatibles con la presencia del grupo *N*-Boc. En las últimas etapas de la síntesis, una vez hidrolizado el éster metílico, se lleva a cabo la activación del grupo carboxilo, vía formación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, y finalmente se hidroliza el grupo *N*-Boc. En principio, esta última transformación se puede efectuar sin mayores problemas en presencia del éster activo, y en la bibliografía se recogen algunos ejemplos en los que este tipo de transformación transcurre con buenos rendimientos.<sup>212,213</sup> Los detalles de esta nueva síntesis se recogen en el esquema 3.21.

La secuencia se inicia con la reacción de Sonogashira entre el enol triflato **20** y el alquino **39** que conduce al producto de acoplamiento cruzado **40**. Hay que mencionar que como producto secundario de la reacción de Sonogashira se aisló también el producto de dimerización del alquino **39** con un rendimiento del 10-11%, fácilmente separable del producto de acoplamiento cruzado durante el proceso de purificación cromatográfica (ver parte experimental).

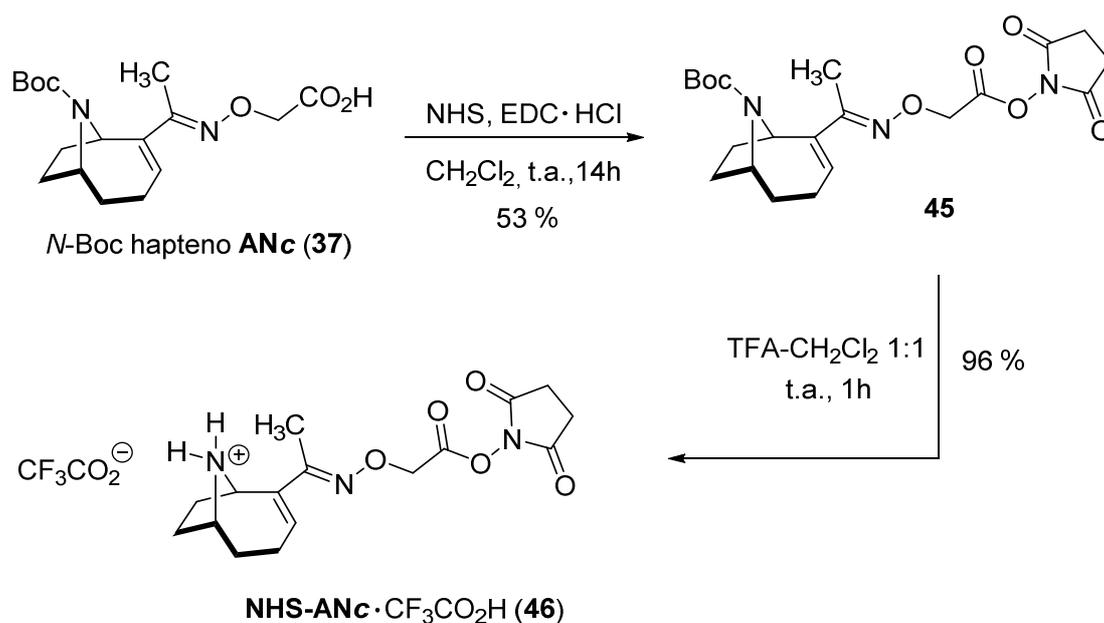


**Esquema 3.21.** Nueva síntesis del hapteno ANm en forma de éster de *N*-hidroxisuccinimidilo

A continuación, la hidratación del triple enlace promovida por  $\text{HgO}\text{-BF}_3$  conduce al ceto-éster **41**. La hidrólisis del éster metílico de **41** se realiza de forma quimioselectiva en las condiciones básicas habituales para proporcionar el ácido carboxílico **42**, a partir del cual se lleva a cabo la activación de dicho grupo por formación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo con el clorhidrato de EDC y NHS. La última etapa que conduce al deseado éster activo del hapteno ANm se realiza en condiciones ácidas anhidras suaves, en las que se produce selectivamente la fragmentación del grupo *N*-Boc de **43** sin que se vea afectado el éster activo del brazo espaciador, proporcionando el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno

AN $m$  como sal del ácido trifluoroacético (**44**), con un rendimiento global, para las cinco transformaciones que implica su preparación desde el enol triflato **20**, superior al 38%.

En cuanto a la preparación del éster activo del hapteno AN $c$ , se llevó a cabo utilizando la misma estrategia seguida para la preparación del éster análogo del hapteno AN $m$ . Para ello se partió del derivado *N*-Boc del hapteno AN $c$  (**37**) preparado previamente (apartado 3.2.2.4, esquema 3.19). La activación de **37** a través del procedimiento que utiliza EDC·HCl-NHS en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> proporcionó el éster de *N*-hidroxisuccimidilo *N*-Boc protegido **45** con un rendimiento del 53% (Esquema 3.22); a partir de éste, y tras desproteger por hidrólisis ácida el grupo amino puente, se obtuvo el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno AN $c$  en forma de sal con el ácido trifluoroacético (**46**).



Esquema 3.22. Preparación del éster activo del hapteno AN $c$

Tanto el éster activo del hapteno AN $m$  como del hapteno AN $c$  fueron caracterizados espectroscópicamente por RMN de <sup>1</sup>H. Aparte de las señales características del sistema 9-azabíclico y del correspondiente brazo espaciador, la formación del éster activo se confirmó por la presencia en ambos espectros de la señal característica correspondiente a los protones del grupo succinimidilo

---

( $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), que se observa en ambos casos como un singlete ancho a  $\delta$  2.84 ppm que integra cuatro hidrógenos.

### 3.2.3.2 Preparación de los bioconjugados proteicos

Una vez activados los haptenos se procedió a acoplarlos covalentemente a proteínas portadoras y a enzimas para obtener los correspondientes conjugados de inmunización, así como los conjugados de tapizado, para ser empleados en el formato competitivo indirecto (ci-ELISA), y los trazadores enzimáticos, para ser empleados en el formato competitivo directo (cd-ELISA). Como es habitual, se utilizaron proteínas diferentes en la preparación de inmunógenos y conjugados competidores de ensayo al objeto de favorecer la selección de anticuerpos dirigidos hacia la porción hapténica del inmunógeno.

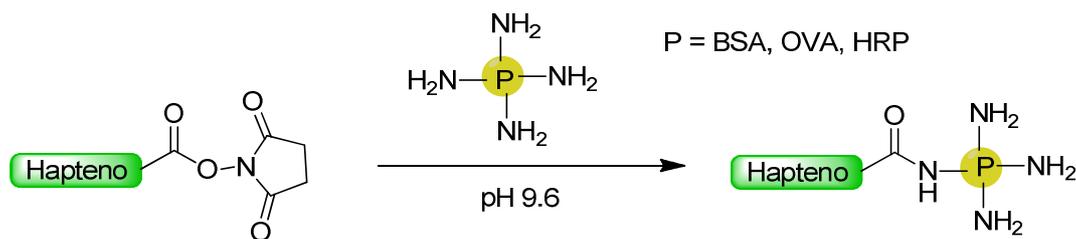
En este trabajo, para la preparación de los conjugados inmunogénicos se escogió a la BSA, una proteína de 67 kDa que tolera bien la carga hapténica sin pérdida de solubilidad y que contiene abundantes grupos funcionales para la conjugación. La BSA es un polipéptido de cadena simple que presenta numerosos grupos carboxilatos libres procedentes de aspartatos y glutamatos, lo que le confiere una carga neta negativa ( $pI = 5.1$ ), así como 59 grupos amino procedentes de residuos de lisinas, de los cuales se estima que 30–35 se encuentran accesibles para su derivatización.<sup>137</sup> Los ésteres activos de los haptenos  $\text{AN}_m$  (**42**) y  $\text{AN}_c$  (**44**) se hicieron reaccionar con BSA en medio básico (tampón carbonato, 50 mM, pH 9.6) para formar los correspondientes conjugados BSA-hapteno.

Por su parte, el hapteno  $\text{AN}_n$ , tal como se mencionó previamente, se activó empleando EDC·HCl y NHS en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y de forma secuencial, sin aislar ni purificar el crudo de reacción, se conjugó a la BSA utilizando el mismo protocolo de conjugación y purificación de los bioconjugados que para los otros haptenos.

Para la preparación de los conjugados de tapizado empleados en el ELISA de formato indirecto se eligió la OVA, una proteína de 45 kDa que contiene 20 residuos de lisinas accesibles para la conjugación con los haptenos. Además, la OVA es un polipéptido de cadena simple que contiene 14 residuos de ácido aspártico y 33 residuos de ácido glutámico que aportan grupos carboxilato,

proporcionándole, al igual que ocurre en la BSA, una carga neta negativa ( $pI=4.63$ ).<sup>137</sup> La obtención de los distintos conjugados OVA-hapteno se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia que para los conjugados de BSA; esto es, se emplearon los restos de lisina disponibles para la formación del enlace amida con los grupos carboxilato de los haptenos activados.

Por último, se prepararon los trazadores enzimáticos empleados en el formato de ELISA directo. Para ello se escogió como enzima la HRP, glicoproteína de 40 kDa de peso molecular que presenta cuatro lisinas disponibles para su conjugación sin pérdida destacable de su actividad enzimática. Los haptenos se acoplaron covalentemente a HRP siguiendo procedimientos análogos a los empleados en la preparación de los conjugados de BSA y OVA (**Figura 3.15**). Las relaciones molares iniciales ( $RM_0$ ) de hapteno-proteína empleadas en cada caso están recogidas en la **Tabla 3.2**.



**Figura 3.15.** Preparación de los conjugados proteicos de los haptenos

Una vez obtenidos todos los conjugados proteicos de BSA, OVA y HRP para cada hapteno, se purificaron por cromatografía de exclusión molecular y se determinó la eficacia de la conjugación por MALDI-TOF-MS, obteniendo en cada caso un valor de relación molar (RM) que indica el número de haptenos promedio acoplados por unidad proteica.

La importancia del valor de RM en el caso de los conjugados de BSA viene determinada por el hecho de que cargas bajas de hapteno pueden dar lugar a una débil respuesta inmunológica, mientras que cargas muy elevadas pueden reducir la afinidad de la respuesta inmune. Así pues, para los conjugados de BSA empleados en la inmunización son deseables relaciones molares de 10:1 a 20:1 (hapteno:proteína). Por otro lado, debido al carácter competitivo de los

inmunoensayos, una carga hapténica elevada en los conjugados competidores de ensayo puede traducirse en un mayor reconocimiento por parte de los anticuerpos, dificultando la unión de los mismos al analito libre; esto es, favoreciendo el equilibrio hacia la formación del complejo anticuerpo-conjugado en lugar de hacia el complejo anticuerpo-analito.<sup>214</sup> Por ello, la RM hapteno:proteína inicial empleada para la preparación de los conjugados de OVA fue menor que la que se utilizó para la preparación de los inmunógenos, y en el caso de los conjugados con HRP la RM inicial fue todavía inferior, ya que el empleo de RM elevadas puede causar la inactivación de la enzima.

En la **Tabla 3.2** se recogen los valores de RM obtenidos por MALDI-TOF-MS para cada conjugado basados en el incremento de masa del conjugado en relación a la masa de la correspondiente proteína sin modificar. Los valores de RM obtenidos para los conjugados de BSA con los haptenos AN $m$  y AN $c$  se encuentran dentro del rango esperable en función del número de residuos de lisina accesibles en esa proteína y las RM<sub>0</sub> iniciales utilizadas. Para el hapteno AN $n$ , la carga hapténica incorporada en el correspondiente conjugado es algo inferior a la esperada en base a la RM<sub>0</sub> del éster activo utilizada, pero dados los problemas comentados de estabilidad del mismo, que probablemente se traduzca en una hidrólisis parcial al correspondiente ácido en las condiciones de conjugación, se consideró que, aunque no óptima, sería suficiente para ser utilizado en el proceso de inmunización.

Por otro lado, los bioconjugados de ensayo con OVA presentaron para los haptenos AN $m$  y AN $c$  una carga hapténica considerada en la práctica como normal, mientras que para el conjugado del hapteno AN $n$  se obtuvo de nuevo, al igual que para el conjugado de BSA, una carga hapténica claramente inferior.

Por lo que respecta a los conjugados de HRP, la RM obtenida para el conjugado del hapteno AN $n$  no pudo determinarse a partir de los datos obtenidos por MALDI-TOF-MS, y en el caso de los conjugados de los haptenos AN $m$  y AN $c$ , de los datos obtenidos se deducen unas relaciones molares hapteno-proteína más elevadas de lo habitual para este tipo de conjugados, pero que, en cualquier caso, permiten claramente asegurar que el acoplamiento tuvo lugar.

**TABLA 3.2.** Valores de RM de los conjugados proteicos de los haptenos AN<sub>n</sub>, AN<sub>m</sub> y AN<sub>c</sub> obtenidos por MALDI-TOF-MS

Conjugado	RM <sub>0</sub>	m/z	Δ(m/z)	Δm/hapteno	RM
BSA	-	66431.0	-	-	-
BSA-AN <sub>n</sub>	24	68316.2	1885.2	233.3	8.0
BSA-AN <sub>m</sub>	24	69810.5	3379.5	233.3	14.5
BSA-AN <sub>c</sub>	24	69952.8	3522.5	220.1	16.0
OVA	-	42749.0	-	-	-
OVA-AN <sub>n</sub>	8	43504.0	755.0	233.3	3.2
OVA-AN <sub>m</sub>	8	44715.0	1966.0	233.3	8.4
OVA-AN <sub>c</sub>	8	44500.0	1751.0	220.1	7.9
HRP	-	43973.5	-	-	-
HRP-AN <sub>n</sub>	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HRP-AN <sub>m</sub>	10	44937.4	963.5	233.3	4.1
HRP-AN <sub>c</sub>	10	44529.0	555.5	220.1	2.5

RM<sub>0</sub>: relación molar inicial hapteno:proteína utilizada para la conjugación

RM: relación molar hapteno:proteína obtenida para cada conjugado

Δ(m/z): (m/z conjugado) – (m/z proteína de referencia)

Δm/hapteno: incremento de masa por cada molécula de hapteno conjugada

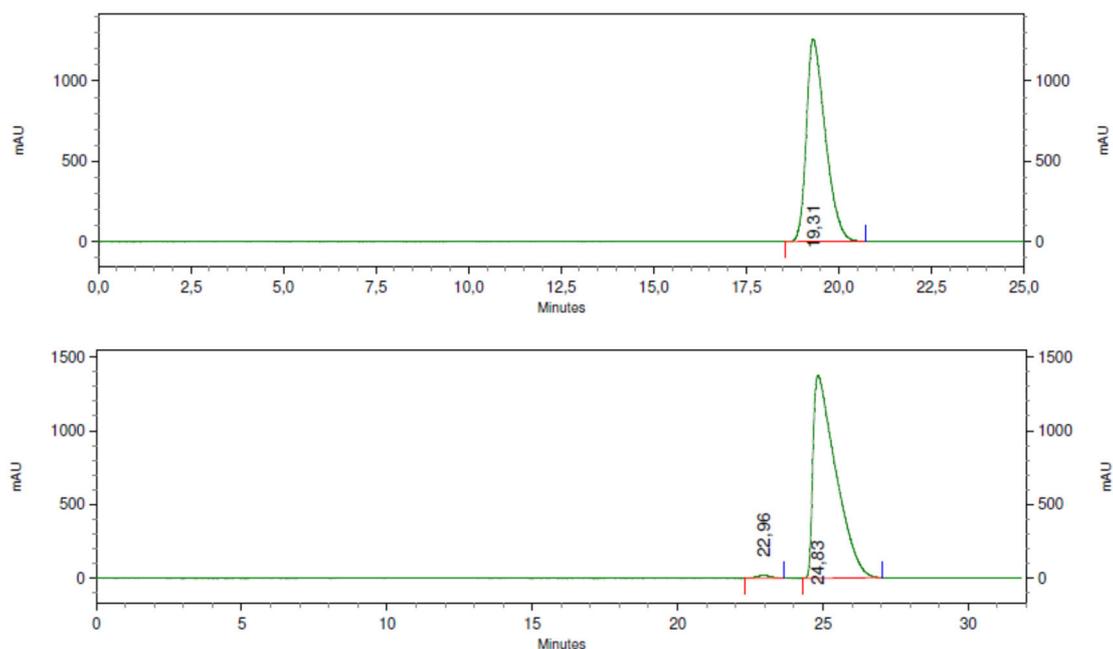
### 3.3 Preparación de anatoxina-a racémica y separación de los enantiómeros (+)- y (-)-anatoxina-a

Una vez preparados los conjugados de los haptenos se procedió a la síntesis de la propia anatoxina-a, ya que la misma se requeriría posteriormente tanto como material de partida para la preparación del hapteno de un derivado de la cianotoxina, hapteno AN<sub>d</sub> (ver página 103), como para ser utilizada como estándar analítico en el proceso de caracterización de los anticuerpos eventualmente generados. En este sentido, y puesto que el proceso de inmunización se realiza con los conjugados preparados con derivados de anatoxina-a racémicos, es previsible que en la respuesta inmune producida se generen anticuerpos frente a ambos esqueletos enantioméricos, el de la (+)-anatoxina-a, el producto natural, y el de la (-)-anatoxina-a, no natural (Figura 3.16). Por lo tanto, en este proceso de caracterización de los anticuerpos producidos es necesario no sólo disponer de la anatoxina-a racémica como estándar analítico, sino también de ambos enantiómeros



El trifluoroacetato de anatoxina-a **47** también se transformó en el correspondiente clorhidrato [(±)-**48**] a través de un intercambio del anión trifluoroacetato por cloruro mediante una resina de intercambio iónico (Amberlita™ IRA-400), tal como se ha descrito previamente para la obtención de los clorhidratos correspondientes a los haptenos AN $n$  y AN $m$  (ver páginas **152** y **155**).

Los primeros intentos de separación por HPLC sobre columna quiral de los dos enantiómeros de anatoxina-a como sal de amonio resultaron infructuosos, por lo que se decidió llevar a cabo su preparación partiendo de la *N*-Boc anatoxina-a **36**, puesto que los dos enantiómeros sí pudieron separarse por cromatografía de alta resolución quiral en condiciones adecuadas (HPLC analítico con columna quiral serie AD-H; ver apartado **5.3.1** de la sección experimental). Así, la separación de los dos enantiómeros, (+)-**36** y (-)-**36**, se llevó a cabo por HPLC semi-preparativa en las condiciones que se especifican al pie de la **Figura 3.17**.

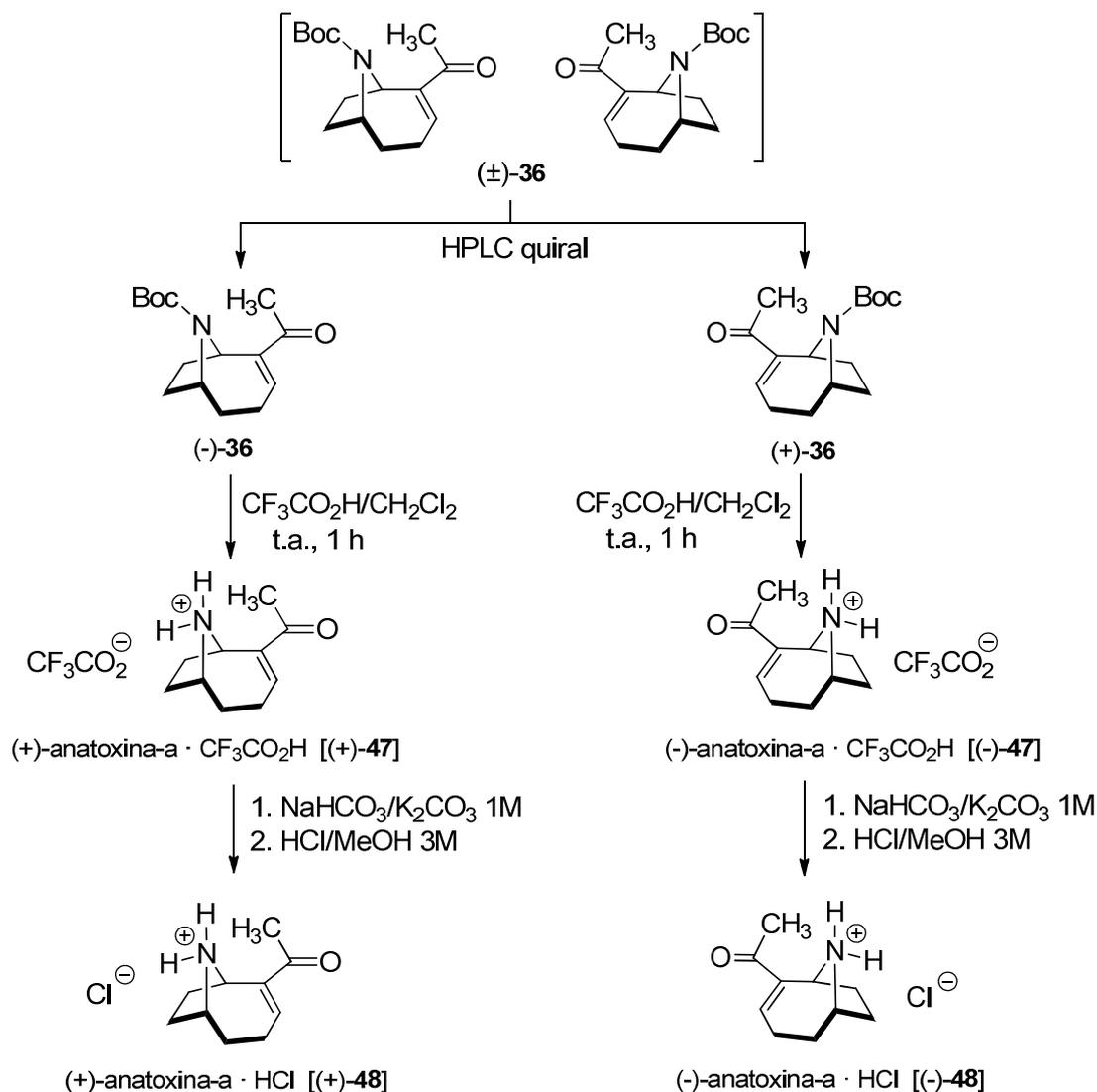


**Figura 3.17.** Cromatogramas de HPLC quiral de los enantiómeros (+)-**36** (superior) y (-)-**36** (inferior) *Condiciones cromatográficas:* columna semi-preparativa quiral serie AD-H DIACEL™ mod. 19335; fase móvil: hexano:isopropanol (99:1); velocidad de flujo: 4 mL/min; presión: 50 bar; detector: UV 230 nm.

El primero de los enantiómeros eluidos, con un tiempo de retención de 19.0 minutos, correspondió al enantiómero dextrógiro, (+)-**36**, obtenido con una pureza enantiomérica muy elevada ( $ee >99\%$ , estimado por HPLC); mientras que el

enantiómero levógiro, (-)-**36**, eluyó con un tiempo de retención de 24.8 minutos y se obtuvo con un *ee* del 99%.

Cada uno de los enantiómeros del derivado *N*-Boc de anatoxina-a se transformó en el correspondiente trifluoroacetato de anatoxina-a mediante hidrólisis ácida, tal como se ha descrito arriba para la mezcla racémica (**Esquema 3.24**).



**Esquema 3.24** Obtención de (+)-anatoxina-a y de (-)-anatoxina-a como trifluoroacetato y clorhidrato

Al objeto de poder comparar la actividad óptica de los dos enantiómeros de anatoxina-a con los datos descritos en la literatura para la cianotoxina natural, y así establecer de forma inequívoca la asignación de la estereoquímica absoluta de cada uno de los enantiómeros separados, se llevó a cabo la transformación de los

trifluoroacetatos en los correspondientes clorhidratos. Esta transformación se realizó, para cada uno de los enantiómeros, a través de una extracción de la anatoxina-a en medio básico acuoso, seguido de formación del clorhidrato mediante el tratamiento de esta con HCl metanólico a temperatura ambiente y concentración a vacío.

La **Tabla 3.3** recoge la actividad óptica (rotación específica,  $[\alpha]$ ) para cada uno de los derivados enantioméricos obtenidos. Es destacable el cambio de signo de rotación óptica que se produce al pasar de los enantiómeros de *N*-Boc-anatoxina-a al correspondiente clorhidrato. La comparación de los valores de rotación específica de los enantiómeros de anatoxina-a separados, tanto del derivado *N*-Boc como del clorhidrato, con los descritos en la bibliografía para los correspondientes enantiómeros obtenidos por síntesis total asimétrica, permite confirmar inequívocamente la asignación de la estereoquímica absoluta realizada para cada uno de ellos.

**Tabla 3.3** Valores de rotación específica  $[\alpha]_D$  de los derivados de anatoxina-a

<i>Derivado anatoxina</i>	$t_R^a$	$[\alpha]_D^{25} \text{ medido}$	$[\alpha]_D^{25} \text{ descrito}$	<i>Referencia</i>
(+)- <b>36</b>	19.0	+43.7°(c 0.37, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	+51.9°(c 0.80, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Ref.197
(-)- <b>36</b>	24.0	-41.1°(c 0.37, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	-46.8°(c 0.84, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Ref. 215 <sup>b</sup>
(-)- <b>48</b>	-	-39.0°(c 0.20, EtOH)	-45° (c 0.30, EtOH)	Ref. 216 <sup>c</sup>
(+)- <b>48</b>	-	+36.6°(c 0.23, EtOH)	+37.3° (c 2.08, EtOH)	Ref. 79 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Tiempo de retención en HPLC (en minutos) en las condiciones que se indican en la figura **3.17**

<sup>b</sup> Otros valores de rotación específica de (-)-**36**:  $[\alpha]_D^{24}$  -47.2° (c 0.84, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

<sup>c</sup> Otros valores de rotación específica de (-)-**48**:  $[\alpha]_D^{25}$  -46.3° (c 0.574, EtOH).

<sup>d</sup> Otros valores de rotación específica de (+)-**48**:  $[\alpha]_D^{27}$  +36° (c 0.85, EtOH);<sup>217</sup>  $[\alpha]_D^{27}$  +43.2° (c 0.68, EtOH).

### 3.4 Síntesis del hapteno de un derivado de anatoxina-a y preparación de bioconjugados

Como se ha mencionado al inicio de esta sección, ante la posibilidad de que el reducido tamaño de anatoxina-a condicionase en exceso la generación de

anticuerpos de elevada afinidad, se abordó también el diseño y síntesis de un hapteno correspondiente a un derivado de la misma (ver páginas 58 y 59, esquema 3.2 y figura 3.3). La idea perseguida era modificar el tamaño de la molécula a detectar para incrementar su carácter inmunogénico, al objeto de aumentar las posibilidades de obtener anticuerpos más afines frente a un derivado adecuado de anatoxina-a que eventualmente permitiesen el desarrollo de un inmunoensayo que indirectamente detectara a la misma.

### 3.4.1 Síntesis y activación del hapteno ANd

Inicialmente, el hapteno ANd se consideró potencialmente adecuado para mimetizar al derivado de anatoxina-a con el reactivo de Sanger (2,4-dinitrofluorobenceno), derivado que los estudios preliminares habían mostrado que podía ser apropiado para el objetivo perseguido.

Como se ilustra en la figura 3.18, la estrategia sintética desarrollada para la síntesis del hapteno ANd se basa en la preparación inicial de una aril-sulfonamida que incorpora el brazo espaciador carboxilado y una sustitución en el anillo aromático adecuada para su incorporación al esqueleto de anatoxina-a por el átomo de nitrógeno puente a través de una sustitución nucleofílica aromática.

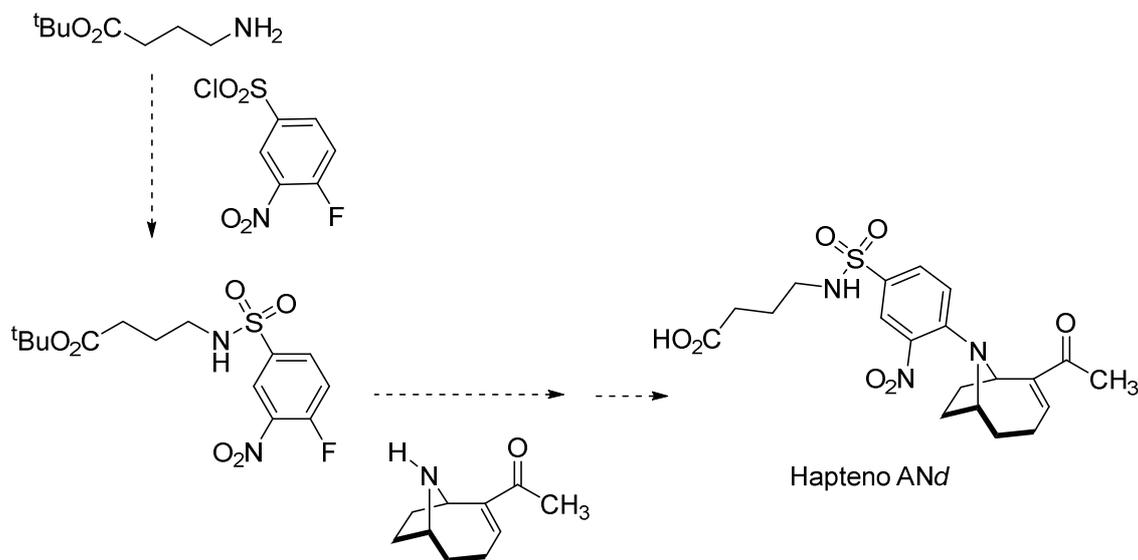
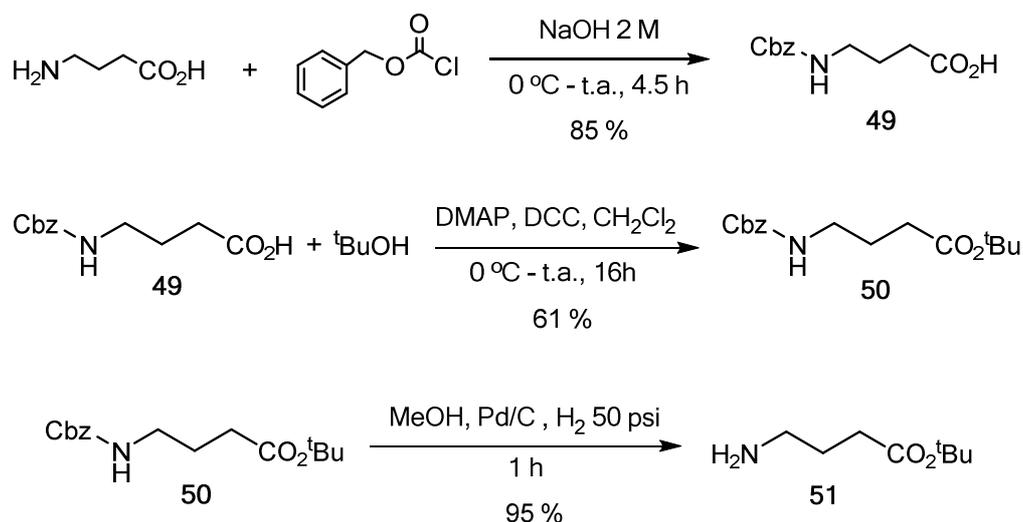


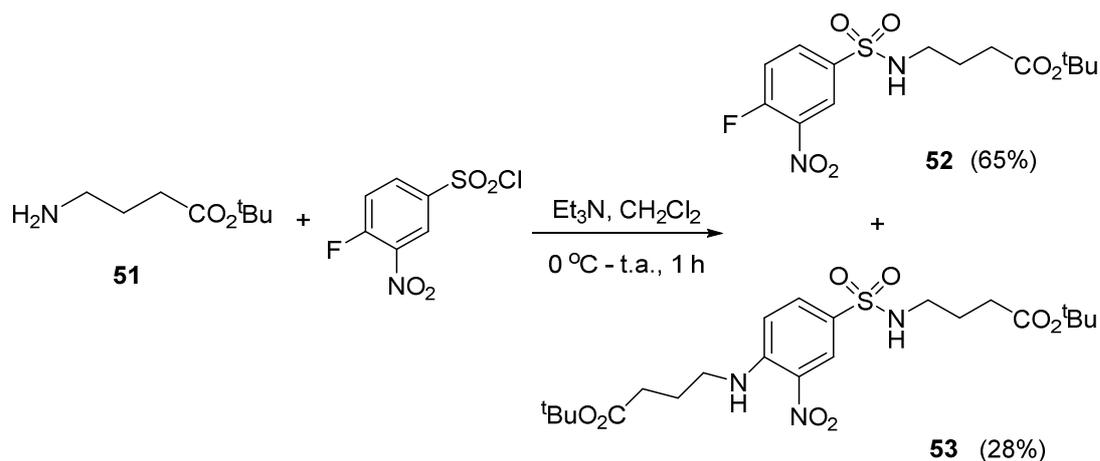
Figura 3.18. Estrategia sintética para la preparación del hapteno ANd

Esta sulfonamida se prepararía a su vez mediante una reacción de amidación a partir del producto comercial cloruro de 4-fluoro-3-nitrobenzenosulfonilo y un derivado esterificado del ácido 4-aminobutírico, no disponible comercialmente y que por lo tanto es necesario preparar. Así pues, la síntesis de la requerida aril-sulfonamida se inició con la preparación del éster *tert*-butílico del ácido 4-amino butírico (**51**) a partir del ácido 4-aminobutírico comercial, según el procedimiento en tres etapas previamente descrito (Esquema 3.25).<sup>218</sup> La síntesis de **51** implica la protección inicial del grupo amino a través del correspondiente derivado benciloxycarbonílico **49**, la transformación del ácido carboxílico en el correspondiente éster *tert*-butílico **50** y, finalmente, la regeneración de la agrupación amino mediante una reacción de hidrogenólisis del grupo benciloxycarbonilo.

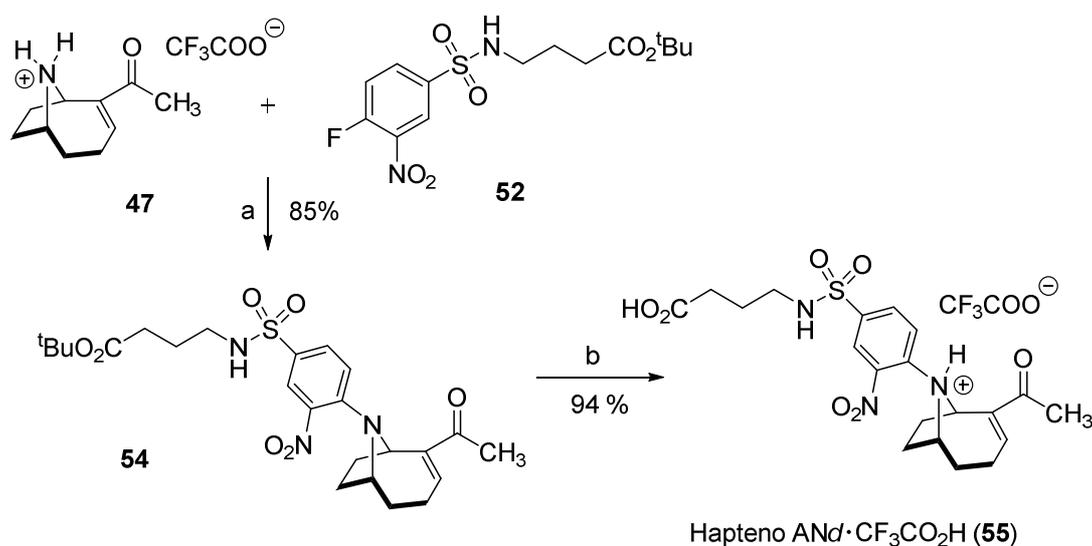


Esquema 3.25. Preparación de la amina **51**

La síntesis de la aril-sulfonamida **52** se realizó por reacción de la amina **51** con cloruro de 4-fluoro-3-nitrobenzenosulfonilo. La reacción, que se lleva a cabo con catálisis básica en condiciones suaves, proporciona mayoritariamente la deseada sulfonamida **52**, junto con el compuesto **53**, proveniente de la reacción de sustitución nucleofílica aromática del átomo de flúor de **52** por el resto amino-alquílico de **51**, una reacción que se produce fácilmente en sustratos de este tipo.<sup>219,220</sup> Ambos productos se separaron fácilmente por cromatografía de columna, obteniéndose **52** y **53** con un rendimiento del 65% y 28%, respectivamente (Esquema 3.26).

Esquema 3.26. Síntesis de la aril-sulfonamida **52**

Una vez se dispuso del derivado **52** se completó la preparación del esqueleto hidrocarbonado del hapteno ANd a través de la reacción de sustitución nucleofílica del átomo de flúor por el nitrógeno puente de anatoxina-a. La reacción se llevó a cabo utilizando la sal del ácido trifluoroacético de anatoxina-a (**47**), preparada previamente como se ha descrito en el apartado 3.3, y *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como catalizador en THF a temperatura ambiente durante 3 h, proporcionando el éster *tert*-butilico del hapteno ANd **54** con un 85% de rendimiento, basado en el material de partida reaccionado (Esquema 3.27).

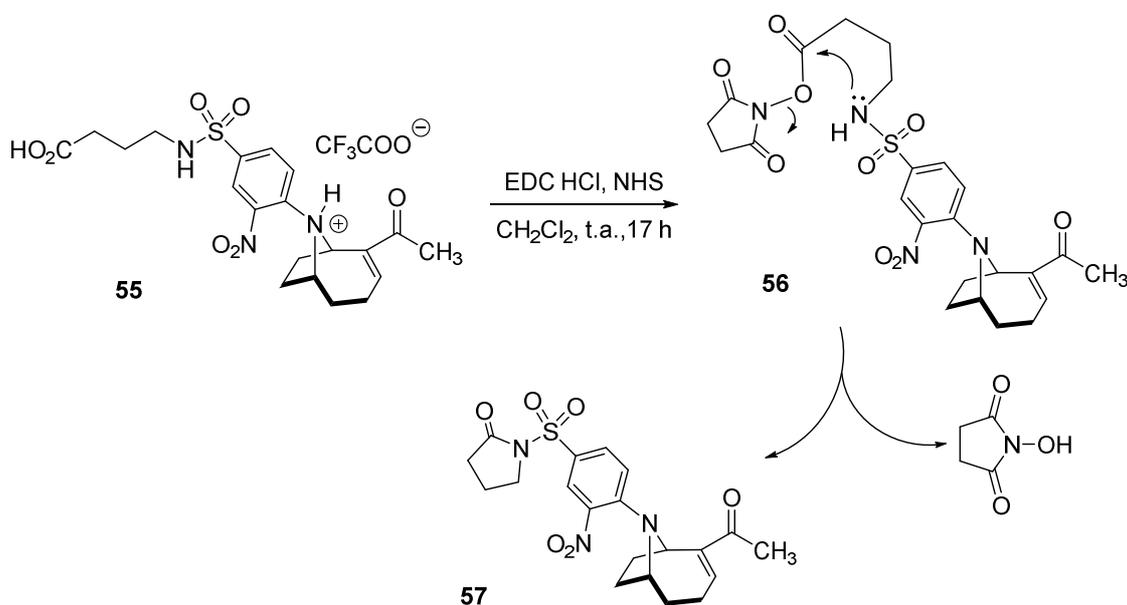


(a) DIPEA, THF, t.a., 3 h; (b) TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1, t.a., 1 h.

Esquema 3.27. Preparación, como sal con el ácido  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ , del hapteno ANd

Finalmente, y tal como se recoge en el **Esquema 3.27**, la síntesis del hapteno ANd **55** se completó mediante hidrólisis del grupo éster *tert*-butílico de **54**, la cual se realizó por tratamiento con una mezcla equimolecular de TFA y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en las condiciones previamente descritas para los otros haptenos. El rendimiento global de **55** desde el amino-éster *tert*-butílico **51** a través de la secuencia de tres etapas descrita fue del 58%.

Con miras a obtener los diferentes conjugados del hapteno ANd fue necesario, al igual que en los otros haptenos, activar el carboxilato vía la formación del éster activo. Sin embargo, todos los procedimientos ensayados para la transformación del grupo carboxilato de **55** en el correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo empleando diferentes carbodiimidas de nuevo no condujeron al éster activo del hapteno **56**, formándose en su lugar el producto de ciclación intramolecular, la sulfonil-lactama **57** (**Esquema 3.28**), cuya estructura se identificó inequívocamente en base a sus datos espectroscópicos de RMN, en los que se observan las señales correspondientes a los tres grupos metileno del anillo lactámico formado a  $\delta$  3.89 ppm (t,  $J = 7.0$  Hz, NCH<sub>2</sub>),  $\delta$  2.45 ppm (t,  $J = 8.0$  Hz, OCH<sub>2</sub>) y  $\delta$  2.09 ppm (quint,  $J = 7.0$  Hz, OCH<sub>2</sub>N).



**Esquema 3.28.** Intento de activación del carboxilato en el hapteno ANd (**55**)

---

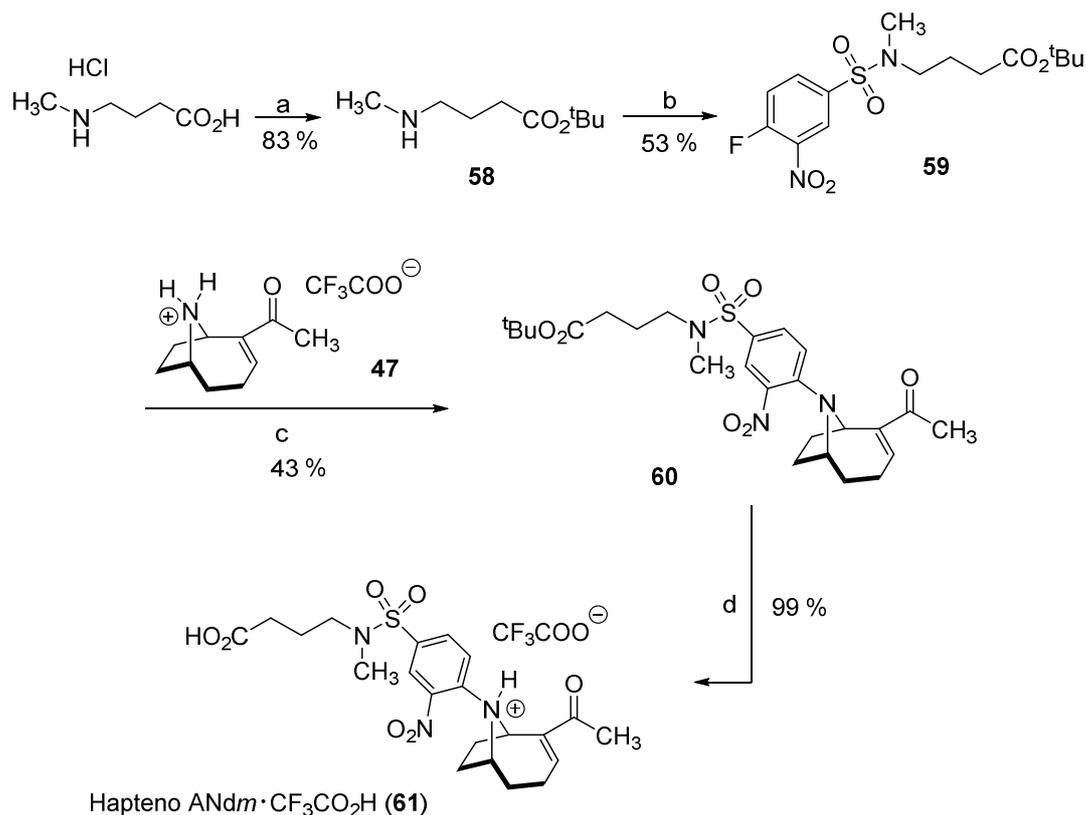
El aislamiento de la sulfonil-lactama **57** en la reacción de activación anterior proviene de la formación inicial del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, **56**, el cual experimenta una ciclación intramolecular por el ataque nucleofílico del nitrógeno del grupo sulfonamida sobre el carbonilo del éster activo, probablemente promovida por la catálisis básica que proporciona el medio de reacción, seguido de eliminación del resto de hidroxisuccinimidilo. Una revisión posterior de la bibliografía reveló que este tipo de ciclación se ha observado previamente en sistemas funcionalmente relacionados.<sup>221,222,223</sup>

### 3.4.2. Preparación del nuevo hapteno derivado de anatoxina-a. Síntesis del hapteno AN $dm$

Ante los problemas encontrados en la activación del hapteno **56**, se decidió modificar estructuralmente el mismo para intentar evitarlos. Se pensó que una solución simple pasaba por utilizar el derivado *N*-metilado de **56**, una modificación estructural que, en principio, no debería comprometer la capacidad del hapteno para mimetizar al derivado con el reactivo de Sanger de anatoxina-a, al tiempo que evitaría la reacción de ciclación observada anteriormente.

La síntesis del nuevo hapteno del derivado de anatoxina-a, el hapteno AN $dm$  (**61**), se llevó a cabo siguiendo una ruta sintética análoga a la utilizada para la preparación del hapteno AN $d$  (**55**), pero partiendo del correspondiente *N*-metil aminoácido (Esquema 3.29).

En este caso se utilizó el clorhidrato del ácido 4-(*N*-metilamino)butanoico comercial como material de partida, que se transformó en el correspondiente éster *terc*-butílico por tratamiento con  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  y exceso de acetato de *terc*-butilo a temperatura ambiente durante 1 h. El resto de transformaciones que conducen al nuevo hapteno AN $dm$  transcurren de forma prácticamente idéntica a la síntesis previamente descrita de AN $d$ , aunque en este caso se obtuvo un rendimiento en la etapa de acoplamiento con anatoxina-a para formar la correspondiente sulfonamida (**60**) claramente inferior al obtenido con el amino-éster no metilado **51**, una circunstancia que es atribuible al mayor impedimento estérico que existe sobre el átomo de nitrógeno en este caso. El rendimiento global fue del 18.7% en cuatro etapas de reacción desde el *N*-metil aminoácido de partida.

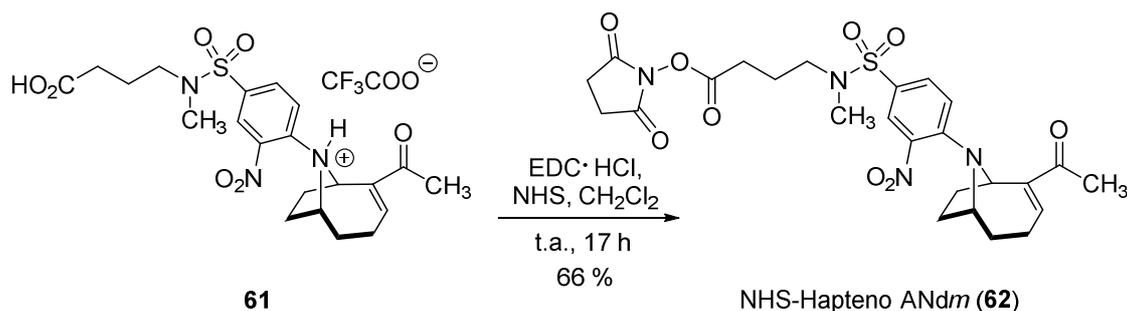


(a) CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu, BF<sub>3</sub> · Et<sub>2</sub>O, 9 °C, 1 h; (b) FNBSO<sub>2</sub>Cl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C - t.a., 1 h; (c) 1.1 eq. DIPEA, THF, t.a., 5 h; (d) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, t.a., 1 h

**Esquema 3.29.** Ruta sintética para la preparación del hapteno ANdm · CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H

Espectroscópicamente, el nuevo hapteno, ANdm (**61**), muestra en los espectros de RMN de <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C unas características prácticamente idénticas a las del hapteno ANd (**55**), con excepción de la señal correspondiente al metilo sobre el nitrógeno de la agrupación sulfonamida, que se observa a δ 2.79/34.8 ppm.

Una vez se dispuso del hapteno **61** se procedió a su activación. En este caso, utilizando EDC-HCl en condiciones estándar, se obtuvo el correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **62** con un rendimiento del 66% (Esquema 3.30).



Esquema 3.30. Obtención del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno ANdm

### 3.4.3 Preparación de los conjugados del hapteno ANdm

La preparación del conjugado inmunizante (BSA-ANdm), de tapizado de ensayo (OVA-ANdm) y el trazador enzimático (HRP-ANdm), se realizó siguiendo el procedimiento equivalente al utilizado anteriormente para la preparación de los conjugados del resto de haptenos (ver parte experimental). Una vez purificados, se determinó la densidad hapténica de cada uno mediante MALDI-TOF-MS.

Los valores para cada conjugado, expresados en términos de relación molar, se encontraron en el rango esperado en función del número de residuos de lisinas accesibles para cada proteína y dentro de los parámetros que se consideran adecuados para la utilización a que va destinado cada uno de ellos (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Valores de RM de los conjugados proteicos del hapteno ANdm obtenidos por MALDI-TOF-MS

Conjugado	$m/z$	$\Delta(m/z)$	$\Delta m/\text{hapteno}$	RM
BSA	66431.0			
BSA-ANdm	73882.0	7451.0	447.1	16.7
OVA	42701.0			
OVA-ANdm	44723.9	2022.9	447.1	4.5
HRP	44001.0			
HRP-ANdm	45029.1	1028.1	447.1	2.3

RM<sub>0</sub>, RM,  $\Delta(m/z)$ ,  $\Delta m/\text{hapteno}$  como en Tabla 3.2

### 3.5 Inmunización y producción de anticuerpos monoclonales

Con cada conjugado BSA-hapteno preparado se inmunizaron cuatro hembras de ratón BALB/c. El protocolo empleado se puede ver con detalle en la sección experimental; básicamente consistió en administrar a cada ratón cuatro inyecciones

intraperitoneales del inmunógeno a intervalos de tres semanas, la primera con adyuvante completo de Freund, las dos siguientes con adyuvante incompleto y la cuarta sin adyuvante. Diez días después de la tercera inmunización se tomó una muestra de sangre de cada animal con el propósito de monitorizar la respuesta inmune a partir del antisuero obtenido.

La evaluación de los antisueros de ratón se realizó mediante ELISA competitivo indirecto. En general, los resultados obtenidos no fueron muy alentadores. Con los inmunógenos de los haptenos AN $m$  y AN $c$ , aun cuando había reconocimiento de los respectivos conjugados de tapizado, tan sólo se apreció una mínima inhibición, obteniéndose curvas sigmoides poco definidas. En el caso de los ratones inmunizados con conjugados de los haptenos AN $n$  y AN $s$  la situación fue incluso peor, ya que ni siquiera se produjo reconocimiento de los conjugados de tapizado. Esta ausencia de respuesta pudo deberse a defectos en la preparación de los conjugados; conviene recordar que, a diferencia de los conjugados basados en los haptenos AN $m$  y AN $c$ , el acoplamiento de los haptenos AN $n$  y AN $s$  se realizó en condiciones menos controladas, sin purificación y caracterización previa de los haptenos activados.

En cuanto a los antisueros procedentes de ratones inmunizados con el conjugado BSA-AN $dm$ , no reconocieron, tal y como era de esperar, a la anatoxina-a, pero sí a la cianotoxina derivatizada con el reactivo de Sanger (AN-DNB). No obstante, dicho reconocimiento fue inferior al esperado, encontrándose los mejores valores de IC<sub>50</sub> en torno a 100 nM.

A pesar de estos resultados, decidimos continuar con el proceso de obtención de anticuerpos monoclonales, ya que no es infrecuente obtener anticuerpos con una afinidad cuanto menos moderada a partir de ratones cuyos sueros no muestran un claro reconocimiento del analito en ensayos competitivos.

### **3.5.1. Generación de hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales**

Cuatro días después de la cuarta inmunización, los animales se sacrificaron y se llevó a cabo la generación de hibridomas. El procedimiento completo de la fusión y las etapas posteriores de estabilización de hibridomas y obtención de los

anticuerpos monoclonales se detallan en la parte experimental. Las fusiones celulares se realizaron con todos los ratones inmunizados, excepto con aquéllos a los que se les había administrado los inmunógenos BSA-ANs y BSA-AN<sub>n</sub>, ya que, como se ha mencionado anteriormente, dichos animales no presentaron una respuesta inmune adecuada.

Para la generación de hibridomas se siguieron protocolos bien establecidos dentro del grupo de investigación.<sup>224</sup> Brevemente, a los ratones se les extirpó el bazo, y los linfocitos extraídos se fusionaron con células de mieloma en relación 4:1 - 5:1. Los resultados de las fusiones celulares se presentan en la **tabla 3.5**. En general se aprecia que la eficiencia de las fusiones resultó satisfactoria, con valores en todos los casos superiores al 70%.

**Tabla 3.5.** Resumen de las fusiones y selección de hibridomas

Conjugado inmunizante	Fusión n°	Eficiencia fusión (%) <sup>a</sup>	Número de pocillos			Hibridomas estabilizados
			Cultivados	Positivos <sup>b</sup>	Competitivos <sup>c</sup>	
BSA-AN <sub>c</sub>	1	85	960	30	0	0
	2	75	960	11	0	0
	3	85	768	40	0	2
	4	73	960	2	0	0
-----						
BSA-AN <sub>m</sub>	1	83	1440	10	0	0
	2	74	864	3	0	0
	3	93	960	206 <sup>d</sup>	0	3
	4	93	1152	64	0	4
-----						
BSA-AN <sub>dm</sub>	1*	96	1632	91	6	4
	3	78	480	21	6	4
	4	74	864	28	3	4

<sup>a</sup> Porcentaje de pocillos cultivados que mostraron crecimiento celular claro mediante inspección visual al microscopio 11 días después de la fusión; <sup>b</sup> Se consideraron positivos aquellos pocillos con valores de  $A_{\max}$  superiores a 0.5 en ausencia de analito; <sup>c</sup> Pocillos con inhibición de la señal mayor del 50% a una concentración de analito (anatoxina-a o derivado AN-DNB, según el caso) de 100 nM; <sup>d</sup> En esta fusión se consideraron positivos los pocillos con señal superior a 1.0 en ausencia de analito; \* Se mezclaron los linfocitos de los bazos de dos ratones y se fusionaron conjuntamente.

Después de cada fusión, el paso siguiente consistió en identificar, de entre todos los hibridomas formados, aquéllos productores de anticuerpos capaces de reconocer a la anatoxina-a (o a su análogo derivatizado en el caso del inmunógeno BSA-AN $dm$ ). Para ello se empleó un proceso secuencial de doble *screening*:<sup>106</sup>

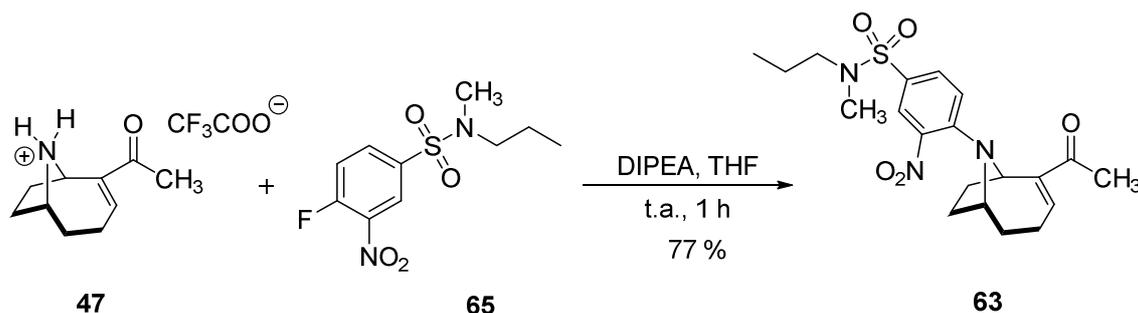
En el primer *screening*, cada sobrenadante de cultivo se analizó en ausencia y en presencia de analito libre mediante ELISA indirecto utilizando el conjugado de tapizado homólogo, lo cual permitió identificar aquellos pocillos cuyo sobrenadante contenía hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer tanto al conjugado de tapizado (pocillos positivos) como también al analito libre (pocillos competitivos).

Mediante este ensayo se observó que en todas las fusiones celulares existían clones positivos, si bien en número altamente variable; así, a modo de ejemplo, en las fusiones realizadas a partir de ratones inmunizados con el inmunógeno BSA-AN $m$ , mientras en una fusión celular (AN $m$ #2) tan sólo se pudo identificar tres pocillos positivos, en otra (AN $m$ #3) el número de pocillos positivos fue de 206. Más destacable resultó el hecho de que, en las fusiones en las que se había empleado BSA-AN $m$  y BSA-AN $c$  como inmunógenos, de entre todos los pocillos positivos ninguno fue competitivo bajo el criterio de inhibir la señal de absorbancia  $\geq 50\%$ . No obstante, algunos pocillos sí mostraron una ligera inhibición (15-20%), por lo que se seleccionaron para realizar un segundo *screening* al día siguiente. En este caso, los sobrenadantes de cultivo se ensayaron a varias diluciones en placas tapizadas con el conjugado homólogo a 2 concentraciones (0.01 y 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y empleando anatoxina-a como competidor a 0, 10 y 100 nM. Como consecuencia de este ensayo bidimensional competitivo<sup>225</sup> se identificaron 2 pocillos a partir de la fusión AN $c$ #3, 3 pocillos a partir de la fusión AN $m$ #3 y 4 pocillos a partir de la fusión AN $m$ #4 que sí reconocieron anatoxina-a en solución a niveles analíticamente relevantes, razón por la que se clonaron y estabilizaron los correspondientes hibridomas.

En cuanto a las fusiones con los ratones inmunizados con el conjugado BSA-AN $dm$ , ya en el primer *screening* se identificaron 15 pocillos cuya señal en

ELISA competitivo se inhibía alrededor del 50% en presencia de anatoxina-a derivatizada con el reactivo de Sanger (AN-DNB). Estos sobrenadantes de cultivo, y algunos más seleccionados por su elevada señal en ausencia de analito, se reevaluaron al día siguiente mediante ELISA bidimensional competitivo. En este caso, las diferentes diluciones de cada sobrenadante se ensayaron en placas tapizadas con el conjugado OVA-AN $dm$  únicamente a 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pero empleando 2 analitos diferentes, AN-DNB y el propio hapteno, AN $dm$ . Este experimento nos permitió comprobar que eran muchos los pocillos de fusión cuyo sobrenadante mostraba una muy elevada afinidad hacia el hapteno, AN $dm$ , mientras que el reconocimiento mostrado hacia AN-DNB era muy inferior. Sólo un anticuerpo mostró una afinidad hacia AN-DNB analíticamente relevante ( $\text{IC}_{50} < 5 \text{ nM}$ ), pero no se consiguió estabilizar el hibridoma correspondiente y en consecuencia se perdió. Esta circunstancia nos obligó a cambiar de estrategia y a buscar un nuevo derivado de la anatoxina-a que presentase mayor analogía estructural con el hapteno inmunizante, y que por tanto pudiera ser reconocido de forma similar a AN $dm$ , con una muy elevada afinidad. La opción más obvia era el propio hapteno AN $dm$  pero sin el carboxilato terminal. Este derivado de anatoxina-a, al que se denominó AN-DM, se sintetizó mediante una aproximación equivalente a la empleada para preparar el hapteno AN $dm$ , pero utilizando un nuevo grupo derivatizante, el compuesto **65** (Esquema 3.31; para detalles de su preparación ver apartado experimental, 5.5.2).

En resumen, finalmente se estabilizaron 21 líneas celulares de hibridomas potencialmente útiles para la inmunodetección de anatoxina-a; 9 de ellas productoras de anticuerpos capaces de reconocer directamente a anatoxina-a libre, y 12 a la cianotoxina derivatizada como un análogo del hapteno inmunizante AN $dm$ . Estudios adicionales nos llevaron a descartar 5 anticuerpos para trabajos posteriores debido a sus inferiores prestaciones, tres anticuerpos derivados del hapteno AN $m$  y los dos anticuerpos provenientes del hapteno AN $c$ .



Esquema 3.31. Síntesis del nuevo derivado de anatoxina-a, AN-DM (63)

### 3.6 Caracterización de anticuerpos

La estimación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales hacia anatoxina-a libre o derivatizada se llevó a cabo mediante ELISA bidimensional competitivo, tanto en formato directo como indirecto, siguiendo procedimientos descritos en la sección experimental e ilustrados en el apartado de introducción.<sup>226</sup>

Para una adecuada evaluación de la afinidad es necesario trabajar a concentraciones de inmunorreactivos óptimas para cada anticuerpo, ya que los valores de  $IC_{50}$  de las curvas de inhibición son consecuencia de un delicado balance de las concentraciones de los inmunorreactivos que participan. En este sentido, un ensayo bidimensional competitivo consiste en combinar, en una misma placa de ELISA de 96 pocillos, varias concentraciones de anticuerpo frente a varias concentraciones de conjugado de tapizado o de trazador enzimático, según el formato utilizado, usando para cada combinación una curva patrón completa de analito. De este modo se genera una familia de curvas de inhibición a partir de las combinaciones posibles, y se selecciona aquélla que da lugar al mejor ensayo atendiendo a parámetros como la pendiente, la absorbancia máxima o el valor de  $IC_{50}$ . En conjunto, todo ello propicia una evaluación más robusta de la afinidad de los anticuerpos.

#### 3.6.1. Anticuerpos monoclonales frente a anatoxina-a

##### 3.6.1.1. Formato indirecto o de conjugado inmovilizado

Los 4 anticuerpos seleccionados, designados como ANm#38, ANm#39, ANm#325 y ANm#44, se ensayaron a tres concentraciones (30, 100, 300 ng/mL)

frente a dos concentraciones de tapizado (0.1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tanto del conjugado homólogo (OVA-AN $m$ ) como del heterólogo (OVA-AN $c$ ), y empleando curvas estándar completas del enantiómero natural (+)-anatoxina-a de siete puntos (desde 0.5  $\mu\text{M}$  en ensayo, factor de dilución 5) más un blanco. En algunos casos la evaluación se repitió usando concentraciones adicionales de conjugado de tapizado. Este tipo de estudio proporcionó una colección de curvas de inhibición con diferentes valores de  $\text{IC}_{50}$  y  $A_{\text{max}}$ . La **tabla 3.6** recoge de manera resumida las concentraciones óptimas de anticuerpo y conjugado de tapizado tanto homólogo como heterólogo que proporcionaron la curva de inhibición con el menor valor de  $\text{IC}_{50}$  y una  $A_{\text{max}}$  entre 0.8 y 1.5.

Los cuatro mAbs caracterizados reconocieron ávidamente a su conjugado homólogo; de hecho, en todas las combinaciones hubo que emplear los conjugados a 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incluso, como se observa para el mAb AN $m$ #39, la concentración óptima fue de 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como se puede observar, los 4 mAbs ensayados mostraron una elevada afinidad hacia anatoxina-a en su forma enantiomérica natural, con valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 2 y 4 nM empleando el conjugado homólogo.

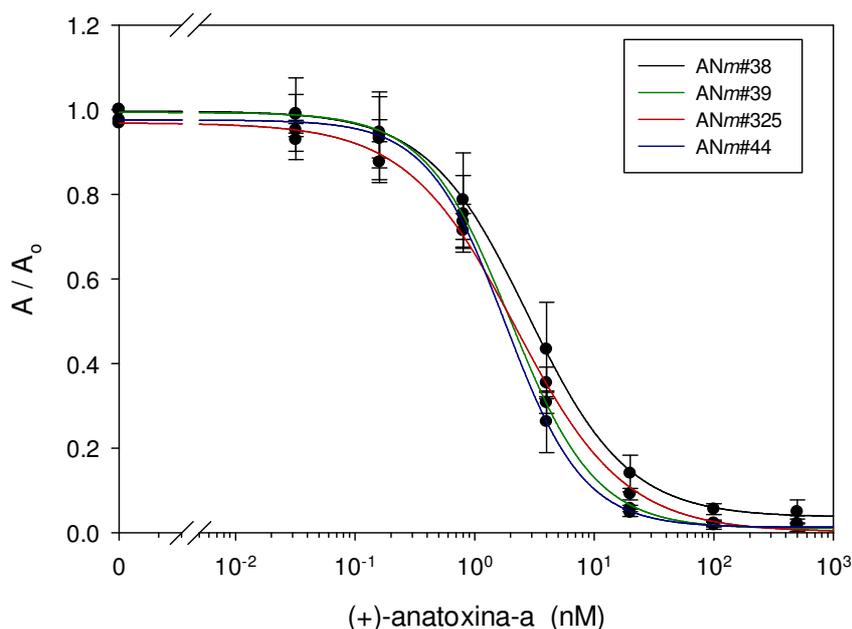
**Tabla 3.6.** Caracterización de los mAbs hacia (+)-anatoxina-a mediante ci-ELISA

mAb	ci-ELISA					
	Conjugado homólogo OVA-AN $m$			Conjugado heterólogo OVA-AN $c$		
	[OVA] <sup>a</sup>	[mAb] <sup>b</sup>	$\text{IC}_{50}$ <sup>c</sup>	[OVA]	[mAb]	$\text{IC}_{50}$
AN $m$ #38	0.1	30	3.10	1.0	30	2.84
AN $m$ #39	0.01	100	3.83	0.1	100	1.96
AN $m$ #325	0.1	30	3.41	1.0	30	2.20
AN $m$ #44	0.1	100	2.31	10.0	100	1.85

<sup>a</sup> Concentración del conjugado de tapizado en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . <sup>b</sup> Concentración del anticuerpo en  $\text{ng}/\text{mL}$ . <sup>c</sup> Todos los valores (nM) son la media de al menos tres experimentos independientes.

Respecto al conjugado heterólogo, las concentraciones más adecuadas fueron superiores, pero en todo caso dentro del rango normal para este tipo de estrategia, con la excepción quizás del mAb AN $m$ #44, para el cual hubo que emplear el conjugado OVA-AN $c$  a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En lo que respecta a la afinidad hacia el analito, los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron ligeramente inferiores (1-3 nM).

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que ha sido posible obtener mAbs de elevada afinidad hacia el enantiómero natural de anatoxina-a, con valores de  $IC_{50}$  en el rango de 1-3 nM aplicando el efecto heterólogo del conjugado de tapizado OVA-ANc. En la **figura 3.19** se han representado las curvas de inhibición de las mejores combinaciones de reactivos para cada uno de los 4 mAbs obtenidos.

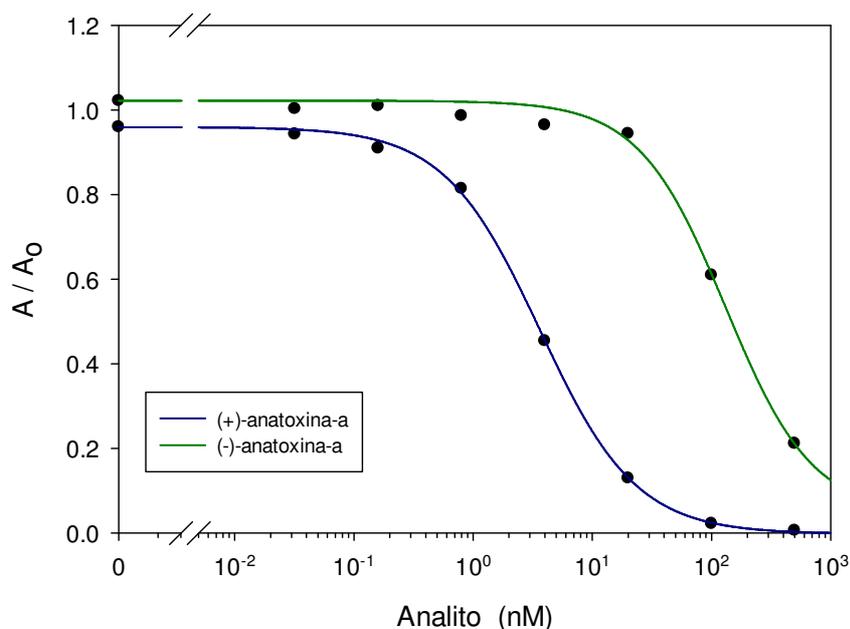


**Figura 3.19.** Curvas de inhibición normalizadas para (+)-anatoxina-a de los ensayos seleccionados en el formato indirecto

Una característica especialmente destacable de los 4 mAbs es su elevada especificidad, ejemplificada en su capacidad para reconocer con gran afinidad a la toxina enantiomérica natural, el enantiómero dextrógiro [(+)-anatoxina-a] al tiempo que reconocen al enantiómero levógiro [(-)-anatoxina-a] con valores de  $IC_{50}$  al menos 100 veces superiores (**Figura 3.20**), tal y como se ilustra en la **figura 3.20** para el mAb ANm#325.

Si bien no sorprende que un determinado mAb posea una elevada enantioselectividad, sí resulta llamativo que todos ellos mostraran una clara preferencia hacia el enantiómero natural. Esta circunstancia habría en principio que atribuirla a factores aleatorios ya que, como se ha comentado previamente, los

*screening* de fusión se realizaron empleando anatoxina-a racémica, por lo que la selección de los anticuerpos en las etapas iniciales no estuvo dirigida hacia un enantiómero en particular, sino que estuvo simplemente basada en la mayor o menor afinidad hacia el analito.



**Figura 3.20.** Reconocimiento del mAb ANm#325 hacia los dos enantiómeros de la anatoxina-a

### 3.6.1.2. Formato directo o de anticuerpo inmovilizado

En este formato cada anticuerpo monoclonal se inmovilizó a 1 µg/mL y se ensayó frente a cuatro concentraciones de trazador enzimático (1000, 300, 100 y 30 ng/mL). Nuevamente se empleó para cada combinación una curva estándar de (+)-anatoxina-a con siete concentraciones (desde 0.5 µM en ensayo, factor de dilución 5) más un blanco.

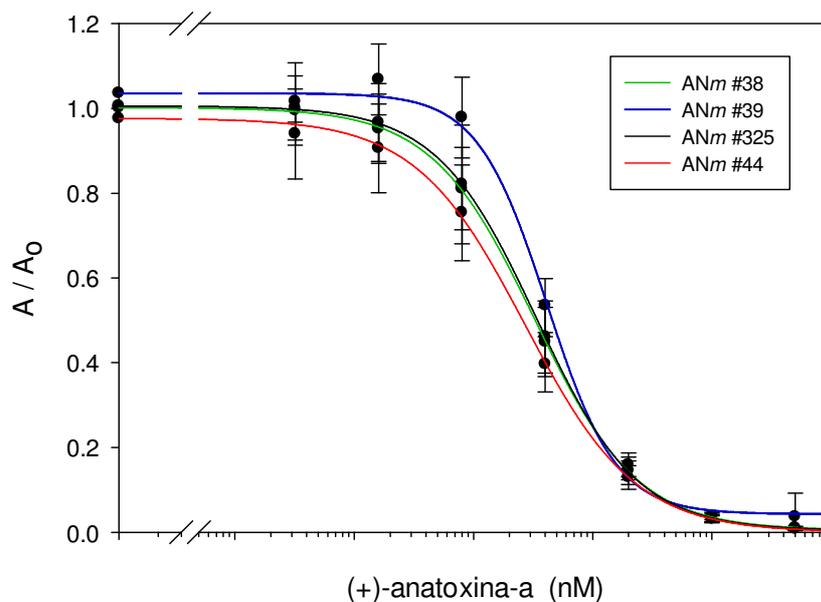
En la **tabla 3.7** y la **figura 3.21**, se presentan e ilustran, respectivamente, los resultados de la caracterización completa de los 4 mAbs anti-anatoxina-a. Como se puede observar, sólo se muestran los datos obtenidos con el conjugado enzimático homólogo, ya que el trazador heterólogo (HRP-ANc) no fue reconocido, ni siquiera empleándolo a 1 µg/mL. Este hecho no resultó especialmente sorprendente, ya que es bien conocida la mayor tolerancia al reconocimiento de conjugados heterólogos

del formato indirecto con respecto al formato directo. En todo caso, el aspecto más relevante de los resultados obtenidos es que, también en este formato, todos los anticuerpos presentan una elevada afinidad hacia (+)-anatoxina-a, con valores de  $IC_{50}$  entre 2 y 4 nM.

**Tabla 3.7.** Caracterización de los mAbs hacia (+)-anatoxina-a mediante cd-ELISA

mAb	[mAb] <sup>a</sup>	[HRP-ANm] <sup>b</sup>	cd-ELISA <sup>c</sup>		
			$A_{max}$	Pendiente	$IC_{50}$ (nM)
ANm#38	1.0	300	1.638 ± 0.235	-0.914 ± 0.075	2.697 ± 0.456
ANm#39	1.0	300	1.008 ± 0.208	-1.391 ± 0.181	3.960 ± 0.319
ANm#325	1.0	300	1.308 ± 0.225	-0.949 ± 0.208	2.880 ± 0.969
ANm#44	1.0	300	1.197 ± 0.402	-0.865 ± 0.196	2.395 ± 0.594

<sup>a</sup> Concentración del anticuerpo en  $\mu\text{g/mL}$ ; <sup>b</sup> Concentración del trazador en  $\text{ng/mL}$ ; <sup>c</sup> Los valores son la media de al menos tres experimentos independientes. Las asíntotas inferiores ( $A_{min}$ ) estuvieron en todos los casos por debajo de 0.05 unidades de absorbancia.



**Figura 3.21.** Curvas de inhibición normalizadas para (+)-anatoxina-a de los ensayos seleccionados en el formato directo.

## 3.6.2. Anticuerpos monoclonales frente a anatoxina-a derivatizada

### 3.6.2.1. Formato indirecto o de conjugado inmovilizado

Los mAbs derivados del hapteno AN $dm$  se caracterizaron en el formato indirecto de manera equivalente a como se ha descrito anteriormente para los mAbs procedentes del hapteno AN $m$ . Se ensayaron tres concentraciones de cada anticuerpo (30, 100 y 300 ng/mL) en placas tapizadas con el conjugado OVA-AN $dm$  a dos concentraciones, 0.1 y 0.01  $\mu$ g/mL, empleando curvas patrón completas de siete puntos (desde 0.5  $\mu$ M en ensayo, factor de dilución 5) de los dos enantiómeros de anatoxina-a derivatizada, (+)-AN-DM y (-)-AN-DM,<sup>xv</sup> más un blanco.

En la **tabla 3.8** se presentan las combinaciones de inmunorreactivos en el formato indirecto que proporcionaron los menores valores de IC<sub>50</sub> para valores de A<sub>max</sub> > 1.0.

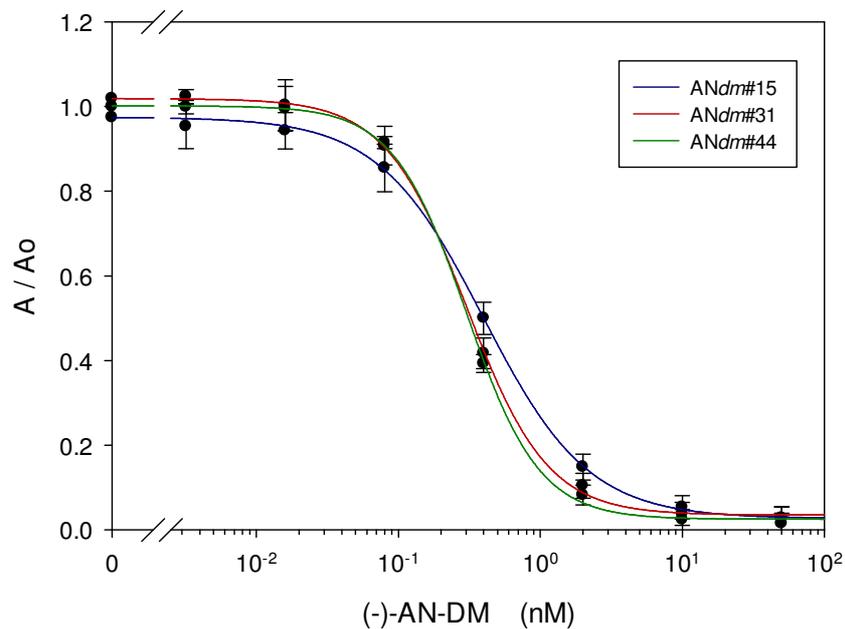
**Tabla 3.8.** Combinaciones de inmunorreactivos seleccionadas para los mAbs frente a anatoxina-a derivatizada en el formato competitivo indirecto.

mAb	Analito	ci-ELISA <sup>c</sup>			
		[mAb] <sup>a</sup>	[OVA-AN $dm$ ] <sup>b</sup>	A <sub>max</sub>	IC <sub>50</sub> (nM)
AN $dm$ -15		30	0.1	1.209 ± 0.048	0.471 ± 0.015
AN $dm$ -119		30	0.1	1.977 ± 0.190	1.028 ± 0.119
AN $dm$ -129		30	0.1	2.228 ± 0.231	1.162 ± 0.456
AN $dm$ -136	(-)-AN-DM	30	0.1	1.215 ± 0.073	0.827 ± 0.153
AN $dm$ -31		30	0.1	1.104 ± 0.098	0.259 ± 0.079
AN $dm$ -33		30	0.1	2.000 ± 0.126	0.599 ± 0.200
AN $dm$ -44		30	0.1	1.195 ± 0.132	0.323 ± 0.079
AN $dm$ -45		100	0.1	1.472 ± 0.122	4.434 ± 2.065
AN $dm$ -32	(+)-AN-DM	30	0.1	1.003 ± 0.032	1,103 ± 0.187
AN $dm$ -35		30	0.1	1.207 ± 0.074	0,651 ± 0.049
AN $dm$ -410		30	0.1	1.571 ± 0.068	4,578 ± 1.410
AN $dm$ -411		30	0.1	1.162 ± 0.069	5,081 ± 0.676

<sup>a</sup> Concentración del anticuerpo en ng/mL; <sup>b</sup> Concentración del conjugado de tapizado en  $\mu$ g/mL; <sup>c</sup> Los valores son la media de al menos tres experimentos independientes. Las asíntotas inferiores (A<sub>min</sub>) estuvieron en todos los casos por debajo de 0.05 unidades de absorbancia.

<sup>xv</sup> Para detalles de la obtención de los enantiómeros correspondientes, ver apartado experimental 5.5.2.2

Los resultados obtenidos muestran de forma concluyente la elevada afinidad de los mAbs obtenidos del inmunógeno BSA-ANdm tanto hacia la (+)-anatoxina-a natural derivatizada, (-)-AN-DM, como hacia su enantiómero no natural derivatizado, (+)-AN-DM. De entre todos los anticuerpos obtenidos destacan los mAbs ANdm#15, ANdm#31 y ANdm#44 para el derivado de (+)-anatoxina-a y el monoclonal ANdm#35 para el derivado de (-)-anatoxina-a. Las curvas de inhibición con los 3 primeros anticuerpos se muestran en la figura 3.22.



**Figura 3.22.** Curvas de inhibición de ensayos seleccionados en el formato indirecto de mAbs derivados del hapteno ANdm hacia (+)-anatoxina-a derivatizada, (-)-AN-DM.

Resulta destacable el hecho, por las implicaciones analíticas que ello supone, de que todos los anticuerpos fueran extraordinariamente específicos, no reconociendo, siquiera parcialmente, al enantiómero contrario, así como tampoco a la propia anatoxina-a ni al grupo derivatizante (Figura 3.23).

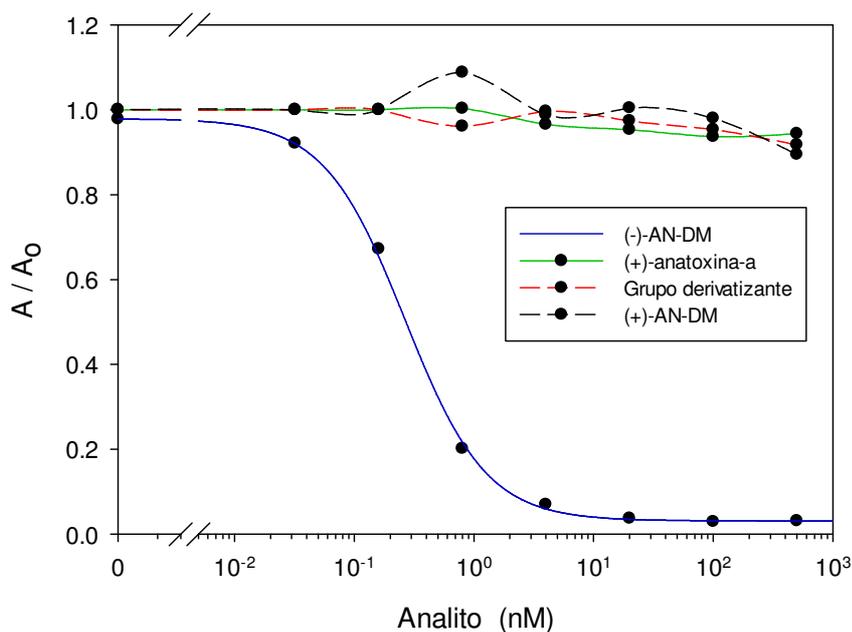


Figura 3.23. Reconocimiento del mAb ANdm#31 hacia diferentes analitos

### 3.6.2.2. Formato directo o de anticuerpo inmovilizado

Para la caracterización de los mAbs de ANdm en este formato, en cada placa de ELISA se combinaron seis concentraciones del trazador de peroxidasa HRP-ANdm (1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL) con el correspondiente anticuerpo inmovilizado a 1.0 µg/mL. Para cada combinación se empleó nuevamente una curva patrón completa del analito enantiomérico correspondiente, de siete concentraciones (desde 0.5 µM en ensayo, factor de dilución 5) más un blanco.

Los datos de la caracterización de todos los mAbs se recogen en la **Tabla 3.9**. Los resultados presentados reflejan la mejor combinación de inmunorreactivos para cada mAb ensayado, es decir, aquélla que proporcionó el menor valor de IC<sub>50</sub> para una señal de A<sub>max</sub> superior a 0.8. De nuevo se observa que, también en este formato, la gran mayoría de los anticuerpos muestran una excelente afinidad, con algunos casos donde los valores de IC<sub>50</sub> son claramente inferiores a 1 nM.

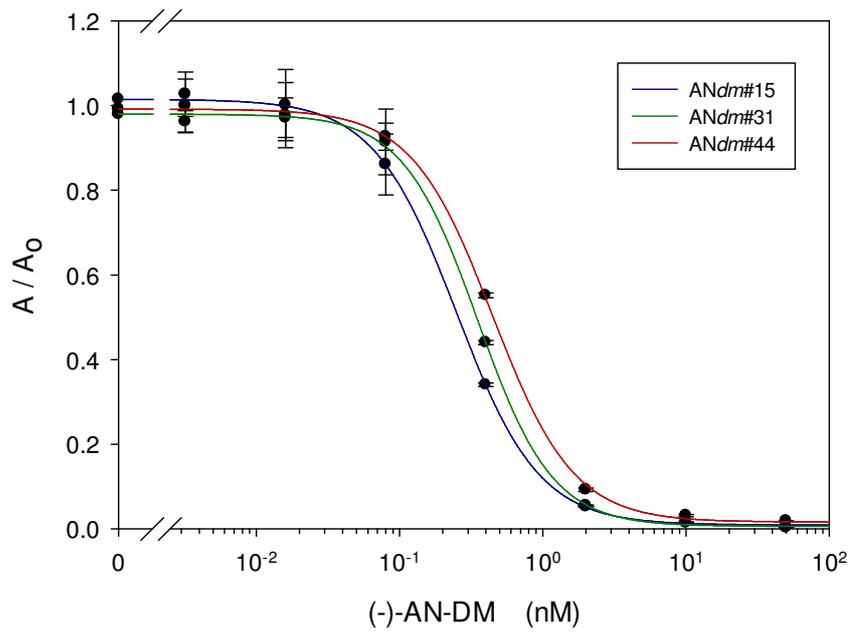
En términos generales, los valores de IC<sub>50</sub> en el formato directo fueron superiores a los observados en el formato indirecto, con algunos casos llamativos, como el representado por el mAb ANdm#119, con una afinidad aparente en el formato

indirecto de 1.028 nM y de 9.036 nM en el formato directo. No obstante, hubo casos en los que dichos valores no difirieron de forma evidente, como se puede observar, por ejemplo, para los mAbs ANdm#15, ANdm#31 y ANdm#44, justamente aquéllos que mostraron la mayor afinidad hacia anatoxina-a derivatizada. Las curvas de inhibición para estos 3 mAbs se muestran en la figura 3.24.

**Tabla 3.9.** Combinaciones de inmunorreactivos seleccionadas para los mAbs frente a anatoxina-a derivatizada en el formato directo.

mAb	Analito	cd-ELISA <sup>c</sup>			
		[mAb] <sup>a</sup>	[HRP-ANdm] <sup>b</sup>	A <sub>max</sub>	IC <sub>50</sub> (nM)
ANdm-15		1.0	30	1.657 ± 0.448	0.369 ± 0.141
ANdm-119		1.0	30	2.222 ± 0.340	9.036 ± 2.718
ANdm-129		1.0	30	1.938 ± 0.202	5.632 ± 2.593
ANdm-136	(-)-AN-DM	1.0	10	0.921 ± 0.059	2.244 ± 0.592
ANdm-31		1.0	10	0.955 ± 0.030	0.333 ± 0.010
ANdm-33		1.0	10	1.259 ± 0.025	1.367 ± 0.151
ANdm-44		1.0	30	2.103 ± 0.313	0.513 ± 0.135
ANdm-45		1.0	30	1.016 ± 0.117	3.033 ± 0.655
ANdm-32	(+)-AN-DM	1.0	30	1.296 ± 0.081	2.487 ± 0.327
ANdm-35		1.0	10	1.331 ± 0.041	4.808 ± 0.527
ANdm-410		1.0	30	1.553 ± 0.387	2.849 ± 0.160
ANdm-411		1.0	30	1.606 ± 0.256	2.351 ± 0.762

<sup>a</sup> Concentración del anticuerpo en µg/mL; <sup>b</sup> Concentración del trazador enzimático en ng/mL; <sup>c</sup> Los valores son la media de al menos tres experimentos independientes. Las asíntotas inferiores (A<sub>min</sub>) estuvieron en todos los casos por debajo de 0.05 unidades de absorbancia.



**Figura 3.24.** Curvas de inhibición para anatoxina-a derivatizada [(-)-AN-DM] de los 3 mejores anticuerpos monoclonales en el formato directo.

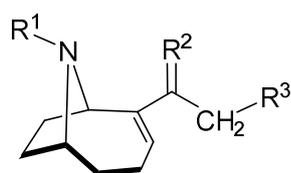


## 4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral ha estado dirigido fundamentalmente a un objetivo: el desarrollo de un inmunoensayo para la determinación analítica directa de la cianotoxina anatoxina-a. Para ello se han cubierto una serie de objetivos particulares que incluyen:

a) Diseño y síntesis de derivados funcionalizados de anatoxina-a (haptenos), potencialmente adecuados para mimetizar este analito y conducir a la producción de anticuerpos específicos y de elevada afinidad frente al mismo.

Con este objetivo se han diseñado y preparado un conjunto de haptenos que incorporan un brazo espaciador carboxilado por posiciones complementarias del esqueleto de la anatoxina-a.



anatoxina-a:  $R^1 = H$ ;  $R^2 = O$ ;  $R^3 = H$

hapteno AN $n$ :  $R^1 = (CH_2)_3CO_2H$ ;  $R^2 = O$ ;  $R^3 = H$

hapteno AN $m$ :  $R^1 = H$ ;  $R^2 = O$ ;  $R^3 = (CH_2)_4CO_2H$

hapteno AN $c$ :  $R^1 = H$ ;  $R^2 = NOCH_2CO_2H$ ;  $R^3 = H$

Desde un punto de vista sintético, los procedimientos seguidos para la preparación de los diferentes haptenos de anatoxina-a diseñados han resultado por lo general sencillos y eficaces, habiéndose logrado la preparación de los mismos con un número razonable de etapas sintéticas y con rendimientos globales elevados. La característica principal de la estrategia sintética utilizada es la capacidad de acceder a los diferentes haptenos diseñados con un mínimo de transformaciones químicas, vía un intermedio común, que adicionalmente también permite la obtención de la propia anatoxina-a de una forma más eficaz que por cualquiera de los procedimientos descritos previamente.

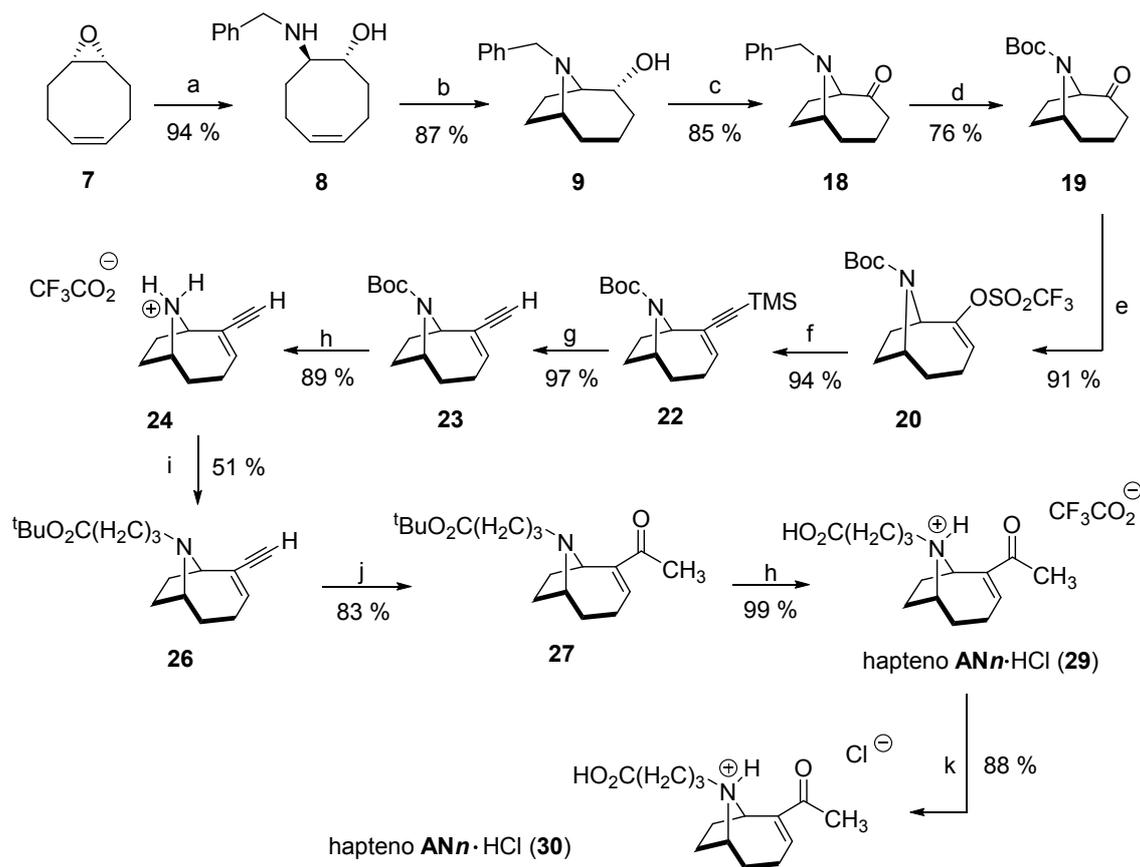
En este contexto, resulta destacable la optimización del procedimiento previamente utilizado para la construcción del esqueleto de 9-aza-biciclo[4.2.1]nonano, la incorporación de los brazos espaciadores hidrocarbonados a la estructura del mismo, tanto por reacciones sencillas de *N*-alquilación como por acoplamiento cruzado de Sonogashira catalizada por Pd(0) entre un enol triflato y un alquino terminal, así como la sencillez de la estrategia de hidratación del

---

alquino que permite completar eficazmente la introducción del grupo carbonilo característico de la estructura de anatoxina-a. Otro aspecto destacable, que en la práctica ha sido clave y fundamental para poder acceder a los diferentes bioconjugados preparados, ha sido la activación de la función carboxílica del brazo espaciador como éster de *N*-hidroxisuccinimidilo a la vez que se mantiene bloqueado el nitrógeno puente del sistema bicíclico como *N*-*tert*-butilcarbamato (*N*-Boc), y la posibilidad de hidrólisis de este último grupo en presencia del primero, lo que conduce a los correspondientes haptenos como ésteres activos en forma de sales de amonio del nitrógeno puente. De esta forma, en ningún momento la función nitrogenada se presenta libre hasta el instante preciso de llevar a cabo la etapa de conjugación.

En los esquemas siguientes se describe de forma resumida las secuencias sintéticas y condiciones de reacción utilizadas en cada una de las etapas para la preparación de los haptenos diseñados, bien como tal, con el grupo carboxilato como ácido libre, bien directamente en forma de éster activo de *N*-hidroxisuccinimidilo.

✚ **Hapteno AN<sub>n</sub>**. Obtenido como sal del ácido trifluoroacético (**29**) o como clorhidrato (**30**), se ha sintetizado en 11 etapas desde el epóxido **7** con un rendimiento global del 16% (**Esquema 4.1**). La primera parte de la secuencia sintética seguida se dirige a la construcción del sistema 9-azabicyclo[4.2.1]nonano, común para anatoxina-a y los diferentes haptenos diseñados, en particular el enol triflato **20**, intermedio clave sobre el que pivota la síntesis de todos los haptenos preparados.

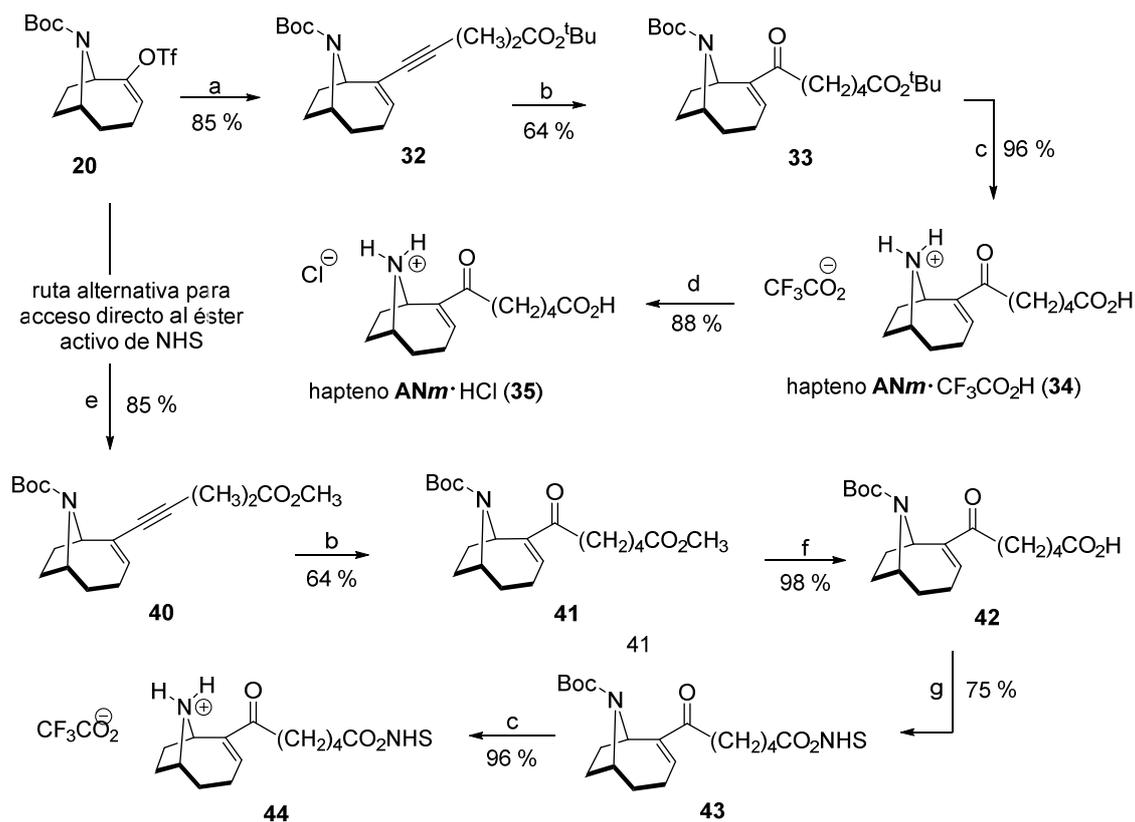


(a) BnNH<sub>2</sub>, MeOH, MW, 110 °C, 16 h. (b) i, Hg(OAc)<sub>2</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, 0 °C, 1 h; ii, NaOH 3M, NaBH<sub>4</sub> (b) Oxidación Swern; (c) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, Boc<sub>2</sub>O, AcOEt, H<sub>2</sub> 60 psi, 12 h. (e) i. KHMDS, THF, -78 °C; ii. Reactivo de Comins. (f) Trimetilsililacetileno, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, DMF, t.a., 1 h. (g) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, t.a., 1 h. (h) TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, t.a., 1 h. (i) Br(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu, CsCO<sub>3</sub>, MeCN, 50 °C, 3 h. (j) i. HgO, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, Cl<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub>H cat., MeOH, t.a., 1 h; ii. PTSA, acetona, 20 min., t.a. (k) Resina Amberlita IRA-400 Cl, H<sub>2</sub>O, t.a., 12 h.

**Esquema 4.1.** Secuencia sintética para la preparación del hapteno AN $n$

✚ **Hapteno AN $m$ .** Obtenido como sal del ácido trifluoroacético (34) o como clorhidrato (35), tanto en forma de ácido libre (34) como en forma de éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (44).

La preparación de este hapteno parte del enol triflato intermedio previamente preparado (20), obteniéndose el hapteno AN $m$  como sal del ácido trifluoroacético (34) o clorhidrato (35) en tres y cuatro transformaciones sintéticas, respectivamente, que transcurren con un rendimiento global del 52% y del 48%. Si consideramos como punto de partida el oxirano 7, la ruta sintética consta de ocho etapas con un rendimiento global de aproximadamente el 25% (Esquema 4.2).



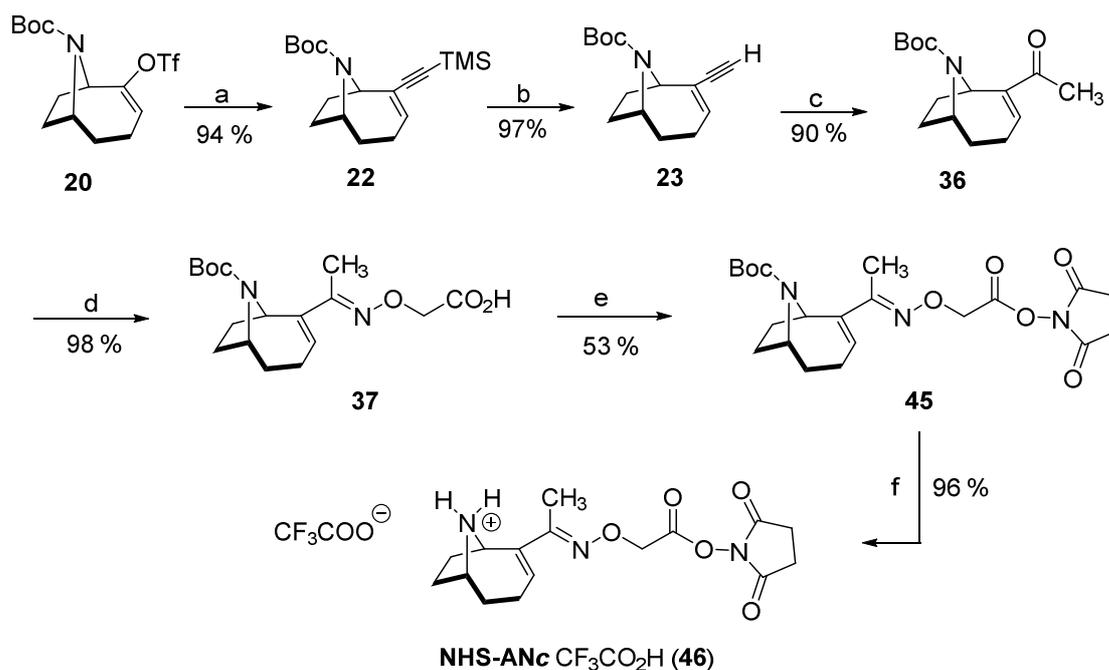
(a)  $(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2^t\text{Bu}$ ,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{CuI}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMF}$ , t.a., 30 min. (b)  $\text{HgO}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{Cl}_3(\text{CO})_2\text{H}$  cat,  $\text{MeOH}$ , t.a., 1 h. (c)  $\text{TFA} \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1, t.a., 1 h. (d) Amberlita IRA-400 Cl,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 12 h, (e)  $(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{CuI}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMF}$ , t.a., 30 min. (f)  $\text{LiOH}$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 30 min. (g)  $\text{EDC HCl}$ ,  $\text{NHS}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 14 h.

**Esquema 4.2.** Secuencia sintética para la preparación del hapteno AN $m$  (**34** y **35**) y su éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (**44**)

Alternativamente, a partir del mismo triflato **20** se ha desarrollado una ruta simple y eficaz para transformarlo directamente en el éster activo de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno AN $m$ . Esta transformación se lleva a cabo en cinco etapas con un rendimiento global del 38%, o en 10 etapas desde el compuesto oxiránico **7**, con un rendimiento global del 18%.

🚩 **Hapteno AN $c$ .** Obtenido como sal del ácido trifluoroacético del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (**46**).

La preparación de este hapteno también utiliza el enol triflato **20** como material de partida (ver **esquema 4.3**).



(a)  $\equiv$ -TMS, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, DMF, 1 h. (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, t.a., 1 h MeOH. (c) HgO, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, Cl<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub>H cat., MeOH, t.a., 1 h. (d) H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, Piridina, EtOH, t.a., 2 h. (e) NHS, EDC·HCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 14 h. (f) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:1, t.a., 1 h.

**Esquema 4.3.** Secuencia sintética para la preparación del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno ANc (46)

El mismo triflato 20 se transforma inicialmente en el *N*-Boc de anatoxina-a (36), a partir del cual se prepara el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno ANc como sal del ácido trifluoroacético, en un total de seis transformaciones sintéticas desde 20 con un rendimiento global del 41%, lo que equivale a nueve etapas desde el epóxido 7 y un rendimiento global de aproximadamente el 38%.

**b) Preparación y caracterización de los bioconjugados de anatoxina-a.**

Los ésteres activos obtenidos de los haptenos AN $m$  y ANc fueron caracterizados espectroscópicamente y utilizados para acoplarlos covalentemente a proteínas portadoras (BSA y OVA) y a enzimas (HRP), mientras que el hapteno AN $n$  fue transformado en el correspondiente éster activo y se utilizó directamente en el proceso de conjugación, sin caracterizar, dada la dificultad encontrada para su purificación. De este modo, para cada uno de los haptenos inicialmente diseñados, se obtuvieron los correspondientes conjugados con BSA, utilizados en el proceso de inmunización, los conjugados con OVA, para ser empleados en el ELISA competitivo

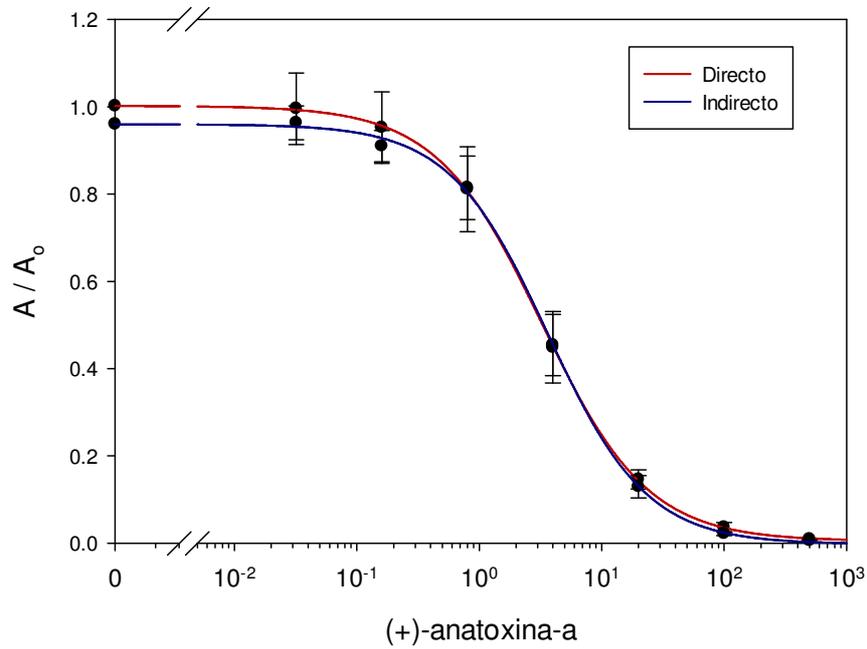
indirecto (ci-ELISA), y los conjugados con HRP, para ser empleados en el ELISA competitivo directo (cd-ELISA). La carga hapténica incorporada en cada uno de ellos tras el proceso de conjugación y purificación cromatográfica se determinó por MALDI-TOF-MS.

c) Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales hacia anatoxina-a.

A partir de los bioconjugados inmunizantes BSA-AN $m$  y BSA-AN $c$  fue posible obtener 9 líneas de hibridomas capaces de reconocer a la anatoxina-a, dos a partir del hapteno AN $c$  y siete a partir del hapteno AN $m$ . De este conjunto de anticuerpos monoclonales destacaron, por su elevada afinidad y especificidad hacia la (+)-anatoxina-a, un subgrupo de cuatro, denominados AN $m$ #38, AN $m$ #39, AN $m$ #325 y AN $m$ #44. Estos anticuerpos, con valores de IC<sub>50</sub> de 1-4 nM, funcionaron de forma adecuada tanto en el formato indirecto como en el formato directo, y resultaron ser extraordinariamente enantioselectivos. Las características más destacadas de los ensayos más sobresalientes se muestran en la **tabla 4.1**.

De los datos presentados en dicha tabla, resulta fácil observar que cualquiera de estos inmunoensayos debería razonablemente permitir la determinación de (+)-anatoxina-a en muestras de agua a niveles claramente por debajo de los recomendados por la Organización Mundial de la Salud para la presencia de esta toxina en aguas.

**Tabla 4.1** Parámetros de ensayo en formato directo e indirecto para (+)-anatoxina-a<sup>a</sup>.



	Inmunoensayo	
	Indirecto	Directo
<i>Inmunorreactivos</i>		
Anticuerpo	ANm#325	ANm#38
[mAb]	30 ng/mL	1.0 µg/mL
Conjugado	OVA-ANc	HRP-ANm
[Conjugado]	1.0 µg/mL	300 ng/mL
<i>Parámetros de la curva</i>		
$A_{max}$	$0.905 \pm 0.081$	$1.638 \pm 0.235$
$A_{min}$	$0.003 \pm 0.021$	$-0.007 \pm 0.017$
Pendiente	$-0.968 \pm 0.144$	$-0.914 \pm 0.075$
$IC_{50}$ (nM)	$2.206 \pm 0.456$	$2.697 \pm 0.456$

<sup>a</sup> Los valores son la media de tres experimentos independientes.

d) Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales hacia anatoxina-a derivatizada.

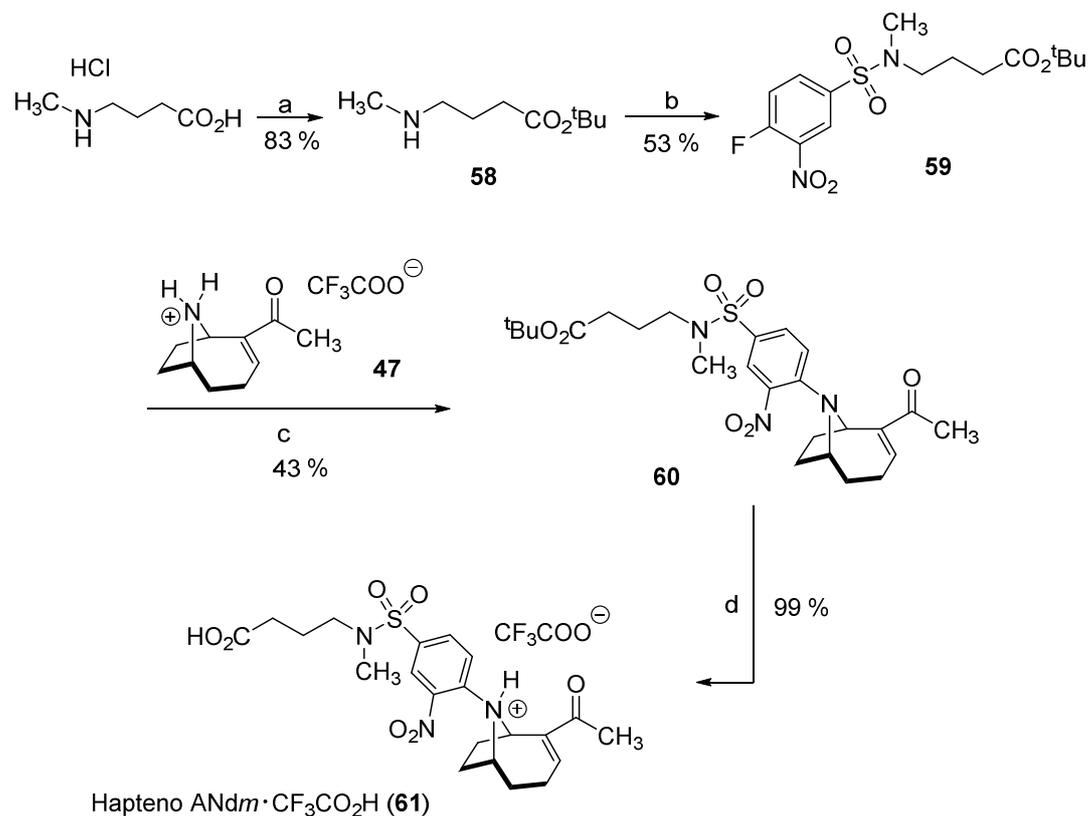
Complementariamente al trabajo dirigido al desarrollo de un inmunoensayo para la determinación analítica directa de anatoxina-a, y ante la posibilidad de que el reducido tamaño del analito condicionase en exceso la generación de anticuerpos de elevada afinidad, circunstancia que finalmente no se produjo, se abordó en paralelo una aproximación encaminada al desarrollo de un inmunoensayo para un derivado de anatoxina-a. En este caso, la determinación de la toxina mediante inmunoensayo implicaría una etapa previa adicional de derivatización, un procedimiento que, por otro lado, es bastante común en diversas metodologías cromatográficas utilizadas para la cuantificación de anatoxina-a e incluso en métodos inmunoquímicos para ciertos analitos especialmente pequeños.

Para alcanzar este objetivo se sintetizó un hapteno adecuadamente funcionalizado que mimetiza la estructura de la anatoxina-a derivatizada con el reactivo de Sanger (AN-DNB). Este hapteno, denominado *ANdm*, se preparó a través de una secuencia sintética de cuatro etapas de reacción desde el ácido 4-(*N*-metilamino)butanoico comercial, y empleando anatoxina-a y el grupo derivatizante **59** como reactivos en la etapa final; el rendimiento global obtenido fue cercano al 18.7% (**Esquema 4.4**).

Tras activación del grupo carboxilato libre del hapteno, el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo resultante se conjugó con las diferentes proteínas siguiendo protocolos equivalentes a los empleados con los haptenos para anatoxina-a libre, obteniéndose relaciones molares acordes con el tipo de proteína empleada en cada caso.

Ante la imposibilidad de estabilizar, durante el tiempo disponible para la realización de esta Tesis Doctoral, una línea de hibridoma que produjera mAbs de elevada afinidad para el derivado AN-DNB, se optó por sintetizar otro derivado que sí fuera reconocido por los hibridomas generados, y que además fuera potencialmente sencillo de preparar por derivatización de la anatoxina-a en muestras acuosas contaminadas. Se partió de la observación de que los hibridomas

obtenidos sí reconocían con una elevada afinidad al propio hapteno AN $dm$ . Este nuevo derivado, denominado AN-DM, se pudo obtener siguiendo una ruta similar a la empleada en la preparación del hapteno AN $dm$  pero sustituyendo en la ruta sintética el clorhidrato del ácido 4-(*N*-metilamino)butanoico por el clorhidrato de la *N,N*-metilpropilamina.



(a) CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu, BF<sub>3</sub> · Et<sub>2</sub>O, 9 °C, 1 h; (b) FNBSO<sub>2</sub>Cl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C - t.a., 1 h; (c) 1.1 eq. DIPEA, THF, t.a., 5 h; (d) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, t.a., 1 h

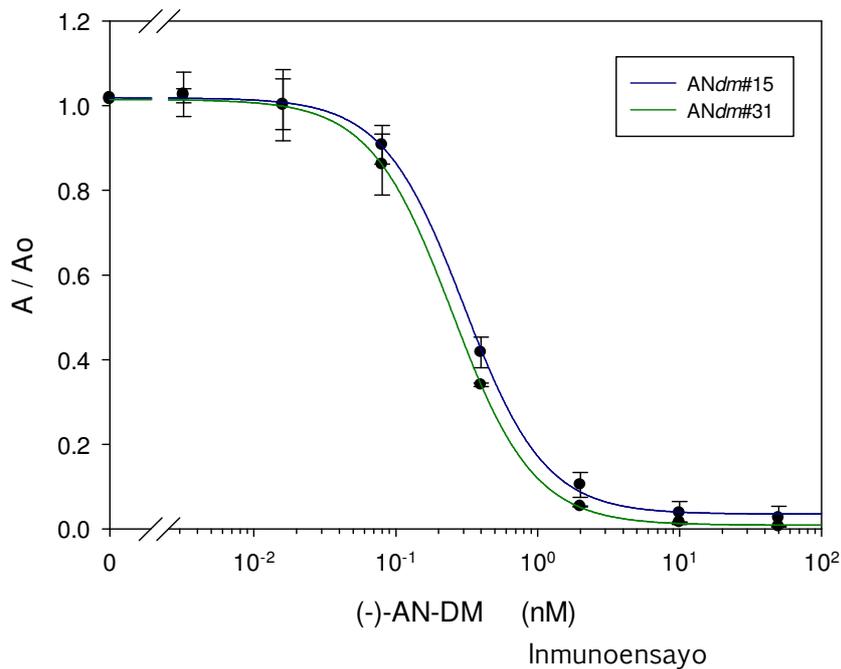
**Esquema 4.4.** Ruta sintética para la preparación del hapteno AN $dm$  · CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H

Como consecuencia del proceso selectivo posterior a las fusiones celulares, se consiguió finalmente estabilizar 12 hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer a la anatoxina-a derivatizada (AN-DM). Los resultados de caracterización de los anticuerpos resultaron concluyentes respecto a su elevada afinidad hacia la anatoxina-a natural derivatizada (-)-AN-DM, o hacia su enantiómero no natural derivatizado (+)-AN-DM, siendo especialmente reseñable el hecho de que 3 mAbs mostraron valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 0.5 nM tanto en el formato indirecto como en el formato directo. Estos inmunorreactivos permitirían eventualmente

desarrollar un inmunoensayo competitivo para anatoxina-a muy sensible basado en la derivatización previa de la muestra a analizar con el compuesto **65**.

En la **tabla 4.2** se presentan las condiciones óptimas para el mejor ensayo indirecto y el mejor ensayo directo con los inmunorreactivos más adecuados para la anatoxina-a derivatizada, el compuesto AN-DM.

**Tabla 4.2.** Parámetros de ensayo en formato directo e indirecto para (+)-anatoxina-a derivatizada (AN-DM)<sup>a</sup>



	Indirecto	Directo
<i>Inmunorreactivos</i>		
Anticuerpo	ANdm#31	ANdm#15
[mAb]	30 ng/mL	1.0 µg/mL
Conjugado	OVA-ANdm	HRP-ANdm
[Conjugado]	0.1 µg/mL	30 ng/mL
<i>Parámetros de la curva</i>		
$A_{max}$	$1.104 \pm 0.098$	$1.657 \pm 0.448$
$A_{min}$	$0.066 \pm 0.045$	$-0.008 \pm 0.002$
Pendiente	$-1.274 \pm 0.317$	$-1.451 \pm 0.181$
$IC_{50}$ (nM)	$0.259 \pm 0.079$	$0.369 \pm 0.141$

<sup>a</sup> Los valores son la media de tres experimentos independientes.

---

## 5. EXPERIMENTAL

### 5.1 Reactivos, aparatos y técnicas generales

#### 5.1.1 Síntesis de haptenos y anatoxina-a

Los puntos de fusión (Pf) de los productos sólidos se midieron en tubos capilares en un aparato Büchi Punto de Fusión M-560 y se proporcionan sin corrección.

Los espectros de infrarrojo (IR) se midieron sin preparación previa de la muestra empleando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) utilizando un espectrómetro Nicolet Avatar Mod. 320 FT-IR. La intensidad de los picos se define como fuerte (f), media (m) o débil (d).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron registrados a 25 °C en un espectrómetro Bruker Avance DRX-300MHz y/o DRX-500MHz a 300.13 y 500 MHz respectivamente, para RMN  $^1\text{H}$ , 282.38 MHz para RMN  $^{19}\text{F}$  y 75.48 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$ ; en cada caso se utilizó el disolvente deuterado que se indica. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se expresan en partes por millón (ppm) relativas a tetrametilsilano (TMS), mientras que para  $^{19}\text{F}$  se expresan en relación a  $\text{CFCl}_3$  y están referenciados respecto a la señal característica del disolvente deuterado empleado en cada caso. El grado de sustitución de los átomos de carbono se determinó mediante secuencias de pulsos  $135^\circ$  DEPT. Las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los diferentes compuestos preparados se asignaron con ayuda de experimentos 2D-RMN, COSY y HSQC; las asignaciones de las señales con el mismo supra índice pueden estar intercambiadas. Los patrones de desdoblamiento espectral, se designaron como: *s* (singlete), *d* (doblete), *dd* (doble doblote), *ddd* (doble doblote doblado), *t* (tripleto), *dt* (doble tripleto), *c* (cuartete), *quint* (quintupleto), *m* (multiplete).

Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se obtuvieron mediante electrospray (ES) en un espectrómetro de masas Q-TOF premier equipado con una fuente de electrospray (Waters, Manchester, UK). Los datos obtenidos están expresados como relación masa/carga ( $m/z$ ). Los disolventes orgánicos se secaron y destilaron antes de su uso según las técnicas más habituales.<sup>227</sup>  $\text{Et}_2\text{O}$ , THF y tolueno se destilaron sobre Na y benzofenona en atmósfera de  $\text{N}_2$  justo antes de ser empleados;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CH}_3\text{CN}$  se destilaron de  $\text{CaH}_2$  bajo  $\text{N}_2$  de igual modo. El MeOH se secó y almacenó sobre tamiz molecular de 3 Å. La DMF se destiló de  $\text{CaH}_2$  a 7 mmHg y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  sobre tamiz molecular de 4 Å. El isobuteno se obtuvo por destilación de una mezcla a reflujo de *tert*-butanol y ácido fosfórico concentrado y se conservó licuado sobre  $\text{MgSO}_4$  a  $-20^\circ\text{C}$ .<sup>228</sup> Los reactivos disponibles comercialmente se emplearon sin tratamiento previo, excepto en aquellos casos en los que se menciona. Las operaciones con reactivos sensibles al aire y/o

---

humedad se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de N<sub>2</sub> seco o argón, empleando jeringas y/o cánulas, material de vidrio secado en estufa a 130 °C y disolventes recién destilados y secos.

Las reacciones asistidas por microondas se efectuaron en un equipo CEM Discover SP-D empleando 300 W de potencia y la temperatura especificada en cada caso.

Las reacciones se monitorizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) empleando placas de gel de sílice Merck 60 F254 de 0.25 mm con indicador fluorescente. La visualización de los productos en la capa fina se llevó a cabo con luz UV de 254 nm y mediante el uso de reveladores como: molibdato cérico amónico acuoso, ácido fosfomolibdico etanólico, ninhidrina o vapores de yodo. Según el caso, después de sumergir las placas en la disolución reveladora se calentaron con un secador industrial hasta coloración adecuada.

La purificación de los compuestos sintetizados se realizó por cromatografía flash en columna sobre gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh), empleando como eluyente la mezcla de disolventes indicada en cada caso, o en un equipo de HPLC semi-preparativo Mod. LaPrep  $\Sigma$  LP1100 VWR™ con columna de fase normal (Kromaphase® 100 SIL 5.0  $\mu$ m, 250x20 mm), fase reversa (Kromasil® 5  $\mu$ m, C18, 100 Å, 250x4 mm) o fase quiral (Chiralpak AD-H Mod. DIACEL™ 19335, 250x100 mm).

El patrón de anatoxina-a racémica y de los dos enantiómeros, el natural (dextrógiro) y el no natural (levógiro), se obtuvieron en el laboratorio según se describe en la sección 5.3. A partir de los mismos se prepararon disoluciones *stock* de trabajo 1 mM en DMF anhidra y se almacenaron a -20 °C. Adicionalmente, también se adquirió una disolución 30  $\mu$ M de (+)-anatoxina-a en metanol/agua (9:91 v/v) y 0.1% de AcOH como material de referencia certificado por el National Research Council de Canadá.<sup>229</sup>

### 5.1.2 Análisis de muestras por UHPLC-MS

Algunos ensayos preliminares de reactividad de anatoxina-a frente a determinados compuestos con carácter nucleofílico tipo tioles, se monitorearon empleando un Cromatografo líquido UHPLC Waters Acquity System (Milford, MA, USA) con sistema binario dispensador de disolvente acoplado a un espectrómetro de masas equipado con detector de triple cuadrupolo (TQD) con fuente de ionización de electrospray Z-espray. Se utilizó una columna C<sub>18</sub> híbrida con puentes de etileno (50 x 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m de tamaño de partícula) de Waters y la fase móvil consistió de mezclas binarias de 0.5 % (v/v) de ácido fórmico en agua Milli Q y CH<sub>3</sub>CN. El volumen de inyección se estableció en 5  $\mu$ L y el flujo se ajustó a 400  $\mu$ L/min. El gradiente se inició con un 50% de CH<sub>3</sub>CN, y se incrementó linealmente hasta 95% de CH<sub>3</sub>CN en 4 min y se mantuvo por 2 min adicionales. El cambio de

polaridad del electroespray de ionización se realizó a 3.5 KV de voltaje capilar, 120 °C de temperatura fuente, un flujo cónico de gas de 50 L/h y empleando nitrógeno como gas de desolvatación a 300 °C a un flujo de 800 L/h. A continuación, se utilizó el software Waters MassLynx 4.1 para el análisis de los resultados de MS y el ratio de área del pico del analito y la del estándar interno se utilizó como señal de respuesta.<sup>xvi</sup>

### 5.1.3 Preparación de conjugados proteicos

La ovoalbúmina (OVA, Grado V) y la peroxidasa de rábano picante (HRP, Tipo VI-A; actividad específica≈250-330 unidades/mg utilizando pirogalol como sustrato) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La seroalbúmina bovina (BSA, Fracción V) fue suministrada por Roche Applied Science. Los reactivos para la activación de haptenos (NHS, DCC, DSC, CFI) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El reactivo de Traut (2-Iminotiolano-HCl), se adquirió de Thermo Scientific. La purificación de los conjugados proteína-hapteno se llevó a cabo empleando columnas Sephadex G-25 HiTrap Desalting, adquiridas de General Electric Healthcare. Como disolución para el proceso de purificación se empleó tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. Los espectros ultravioleta-visible (UV) de los conjugados se monitorizaron empleando un lector PowerWave HT de BioTek Instruments.

#### 5.1.3.1 Análisis de conjugados proteicos por MALDI-TOF-MS

El número de moléculas de hapteno acopladas por molécula de proteína se realizó mediante espectrometría de masas en un equipo 5800 MALDI TOF-TOF (ABSciex) en modo linear positivo (1500 disparos para cada posición) en un intervalo de masas de 10000–120000  $m/z$ . La preparación de las muestras se realizó disolviendo los liofilizados en 100  $\mu$ L de una disolución acuosa conteniendo un 2% de MeCN y 0.1% de TFA; la concentración teórica final es 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Así 0.5  $\mu$ L de cada disolución fueron trasvasados al plato de MALDI y tras haber dejado secar las gotas de la alícuota a temperatura ambiente, finalmente se añadió 0.75  $\mu$ L de matriz (5 mg/mL, estándar analítico Bruker) en 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (7:3, v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente.<sup>xvii</sup>

Al objeto de minimizar el error en la asignación de la masa tanto de la proteína de referencia como del conjugado proteína-hapteno, se utilizó el software mMass-Open Source Mass Spectrometry Tool versión 5.5.<sup>xviii</sup> La diferencia de masa entre los espectros de la proteína de referencia y la proteína modificada, dividida

<sup>xvi</sup> <http://www.uv.es/uvweb/nullca/scsie/seccions/espectrometria-masses/equips-1285876929053.html>

<sup>xvii</sup> SCSIE, Unidad de Proteómica, Universidad de Valencia. [http://www.uv.es/uvweb/servei-central-suport-investigacio-exp erimental/ca/scsie/seccions/preotomica/presentacio-1285876921913.html](http://www.uv.es/uvweb/servei-central-suport-investigacio-exp%20erimental/ca/scsie/seccions/preotomica/presentacio-1285876921913.html)

<sup>xviii</sup> [www.mmass.org](http://www.mmass.org)

---

por la masa adicionada por cada molécula de hapteno, indicó el promedio de incorporación del hapteno correspondiente.

#### 5.1.4 Cultivos celulares y producción de anticuerpos

Los adyuvantes completo e incompleto de Freud, el suero bovino fetal (SBF, F-7524), el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, alto contenido en glucosa), el tampón de lisis de eritrocitos Hybri-Max, la disolución de L-Alanina-L-Glutamina (200 mM), la disolución de aminoácidos no esenciales (100x) y el polietilenglicol (PEG 1500) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El suplemento de fusión y clonaje para hibridomas (HFCS, 50x) se obtuvo de Roche Applied Science. La gentamicina (50 mg/mL), el suplemento HT (hipoxantina 5 mM, timidina 0.8 mM; 50x) y el suplemento HAT (hipoxantina 5 mM, aminopterin 20  $\mu$ M, timidina 0.8 mM; 50x) se obtuvieron de Gibco BRL. El dimetilsulfóxido (DMSO) fue adquirido de Scharlau. La purificación de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo en columnas HiTrap Protein G HP, obtenidas de General Electric Healthcare. En dicha purificación se empleó tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.4, para el equilibrio y carga de la columna; tampón citrato sódico 100 mM, pH 2.5, como tampón de elución y Tris-HCl 1M, pH 9.5, como tapón de neutralización.

Las hembras de ratón BALB/c (BALB/cAnNCr) y de conejo blanco New Zealand [Crlc: KBL (NWZ)] fueron suministradas por Charles River Laboratories International, y estabuladas en el animalario de la Universidad de Valencia. La línea celular de plasmacitoma de ratón P3-X63-Ag8.653 fue obtenida a partir de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera controlada con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad en un incubador ThermoElectron. Todos los materiales de plástico utilizados para cultivos celulares fueron de Corning.

#### 5.1.5 Análisis mediante ELISA

Las placas Costar de poliestireno *high-binding* de 96 pocillos fueron suministradas por Corning. El antisuero policlonal de conejo anti-ratón marcado con HRP (RAM-HRP) se obtuvo de Dako. La *o*-fenilendiamina (OPD) y el Tween 20 se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Las absorbancias del ELISA se midieron con un lector de microplacas PowerWave HT (BioTek). Las placas de ELISA se lavaron en un lavador automático de placas modelo ELx405, adquirido de BioTek Instruments. Los tampones y disoluciones empleadas en las diversas etapas de los ELISAs consistieron en:

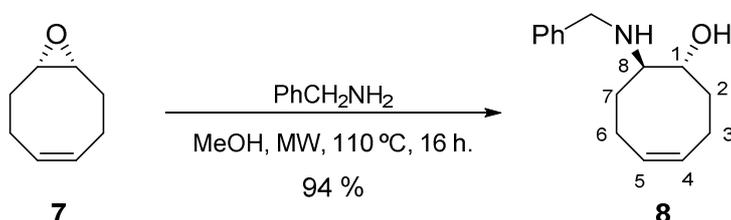
- ✚ **Tampón de tapizado:** tampón carbonato-bicarbonato sódico 50 mM, pH 9.6.
- ✚ **PBS:** tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, 140 mM NaCl.
- ✚ **PBST:** PBS, Tween 20 0.05% (v/v).

- ✚ **Disolución de revelado:** tampón de revelado (25 mM citrato sódico y 62 mM fosfato sódico, pH 5.4) con 2 mg/mL de OPD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.012% (v/v).
- ✚ **Disolución de parada de la reacción enzimática:** H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.
- ✚ **Disolución de lavado:** NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05% (v/v).

## 5.2 Síntesis de haptenos

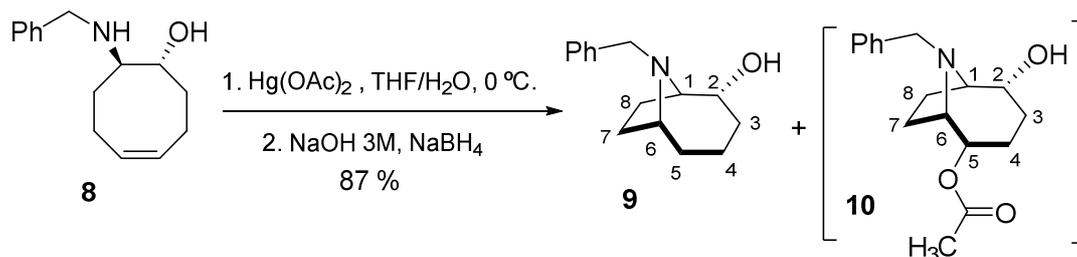
### 5.2.1 Síntesis de los haptenos AN<sub>n</sub>, AN<sub>m</sub> y AN<sub>c</sub>.

#### 5.2.1.1 Obtención del esqueleto azabíclico de anatoxina-a y los haptenos



*rac*-(1*R*\*,8*R*\*,2)-8-(Bencilamino)ciclooct-4-enol (**8**). En un tubo de reacción para microondas, se prepara una disolución conteniendo 1.2 g (9.64 mmol) del epóxido **7** y 2.11 mL (19.28 mmol) de bencilamina en 18 mL de metanol. La reacción se mantiene durante 16 h a 110 °C (300 W). Finalizado el tiempo, la mezcla de reacción se concentra a sequedad y al residuo se adicionan 15 mL de hexano, que tras homogeneizar y enfriar proporcionan un sólido. El amino-alcohol **8** se obtiene por filtración como un sólido blanco (1.577 g, 71%). El residuo obtenido de la concentración del filtrado se purifica por cromatografía, eluyendo con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con un 5% de metanol, para obtener una cantidad adicional del amino-alcohol **8** como un sólido blanco (522 mg, 23%, lo que representa un rendimiento global de **8** del 94%). El compuesto **8** obtenido ha sido descrito previamente<sup>230</sup> (CAS No. 105282-60-8), y las propiedades espectroscópicas de RMN obtenidas coinciden con las reportadas.<sup>231</sup>

**Datos espectroscópicos de 8:** Pf. 71–72 °C (CHCl<sub>3</sub>) [Lit.<sup>232</sup> 70–71 °C]; IR (ATR) $\nu_{\text{max}}$ /cm<sup>-1</sup> 3282d, 3021d, 2941d, 2911d, 2840d, 1678m, 1581d, 1454m, 1431m, 1135m, 1029m, 697f; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.40–7.21 (5H, m Ph), 5.67 y 5.53 (cada uno 1H, cada uno m, H-5 y H-4), 3.83 y 3.68 (2H, sistema AB,  $J$  = 12.7 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 3.34 (1H, ddd,  $J$  = 11.0, 8.7, 3.4 Hz, H-1), 2.61 (1H, ddd,  $J$  = 11.0, 7.8, 3.9 Hz, H-8), 2.40–2.08 (2H, m, H-6), 2.23 (2H, m, H-3), 2.17–1.43 (2H, m, H-2), 2.06–1.40 (2H, m, H-7); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz)  $\delta$  140 (C-1' Ph), 130.8 (C-4)\*, 128.6 (C-3' y C-5' Ph), 128.3 (C-2' y C-6' Ph), 128.0 (C-4' Ph), 127.3 (C-5)\*, 72.1 (C-1), 60.5 (C-8), 53.2 (CH<sub>2</sub>-Ph), 34.7 (C-2), 32.6 (C-6), 23.3 (C-3), 23.0 (C-7); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO [M+H]<sup>+</sup> 232.1696, encontrada 232.1700.



***rac*-(1*R*\*,2*R*\*,6*R*\*)-9-Bencil-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-2-ol (9).** En un matraz conteniendo 2.555 g (8.05 mmol) de  $\text{Hg(OAc)}_2$  se adicionan 40.9 mL de THF- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) con agitación enérgica y enfriando a 0 °C. Sobre dicha mezcla se adiciona por goteo lento una disolución de 1.577 g (6.82 mmol) del amino-alcohol **8** en 13.7 mL de THF. La agitación se mantiene durante 30 min y se adicionan 8 mL de una disolución 3 M de NaOH (24 mmol), seguida de una disolución de 309 mg (8.12 mmol) de  $\text{NaBH}_4$  en 16.3 mL de NaOH 3 M. Se agita a 0 °C durante 15 min y posteriormente otros 15 min a temperatura ambiente. Para procesar la reacción se deja separar el mercurio metálico formado y la fase acuosa se decanta, para posteriormente extraerla con tres fracciones de  $\text{Et}_2\text{O}$ . Las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente, se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente cloroformo, para obtener el alcohol bicíclico **9** como un aceite incoloro (1.375 g, 87%). El compuesto **9** obtenido ha sido descrito previamente<sup>90</sup> (CAS No. 105282-60-8), y las propiedades espectroscópicas obtenidas coinciden con las descritas.

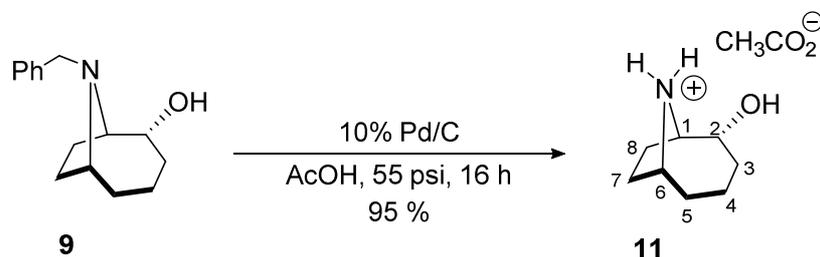
**Datos espectroscópicos de 9:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3346d, 2926m, 1493d, 1474m, 1451m, 1354d, 1303d, 1263d, 1216d, 1154d, 1098d, 1026m, 880d;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.44-7.14 (5H, m Ph), 3.85 (1H, ddd,  $J = 9.5, 4.9$  Hz, H-2), 3.76 y 3.70 (2H, sistema AB,  $J = 13.7$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.31-3.22 (2H, m, H-6 y H-1), 2.33 y 1.45 (1H, m, H-3), 1.96-1.67 (5H, m, H-8, H-7, H-4), 1.69-1.45 (2H, m, H-4, H-3), 1.30-1.22 (2H, m, H-5).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz)  $\delta$  141.3 (C-1 Ph), 128.3 (para todos C-2, C-3, C-5, C-6 Ph), 126.8 (C-4 Ph), 73.8 (C-2), 68.8 (C-1), 61.8 (C-6), 61.0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 36.0 (C-5), 33.4 (C-7), 32.7 (C-3), 22.4 (C-8), 19.9 (C-4); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  232.1696, encontrada 232.1699.

Posterior elución con el mismo eluyente proporcionó el hidroxi-acetato **10** (158 mg, 10%).

**Datos espectroscópicos de 10:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.32-7.16 (5H, m, Ph), 5.21 (1H, dt,  $J = 11.6, 6.0$ , Hz, H-5), 4.06 (1H, ddd,  $J = 11.4, 11.4, 10.7$ Hz, H-2), 3.95 y 3.90 (2H, sistema AB,  $J = 13.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.81 (1H, m, H-6), 2.66 (1H, m, H-1), 1.98 (3H, s, Me), 1.98 y 1.79 (2H, m, H-4), 1.97 y 1.82 (2H, m, H-8), 1.97 y 1.73 (2H, m, H-3), 1.89 y 1.76 (2H, m, H-7);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz)  $\delta$  170.8 (C=O,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 139.7 (C-1, Ph), 128.4 (C-2 y C-6, Ph), 128.3 (C-3 y C-5, Ph), 127.1 (C-4,

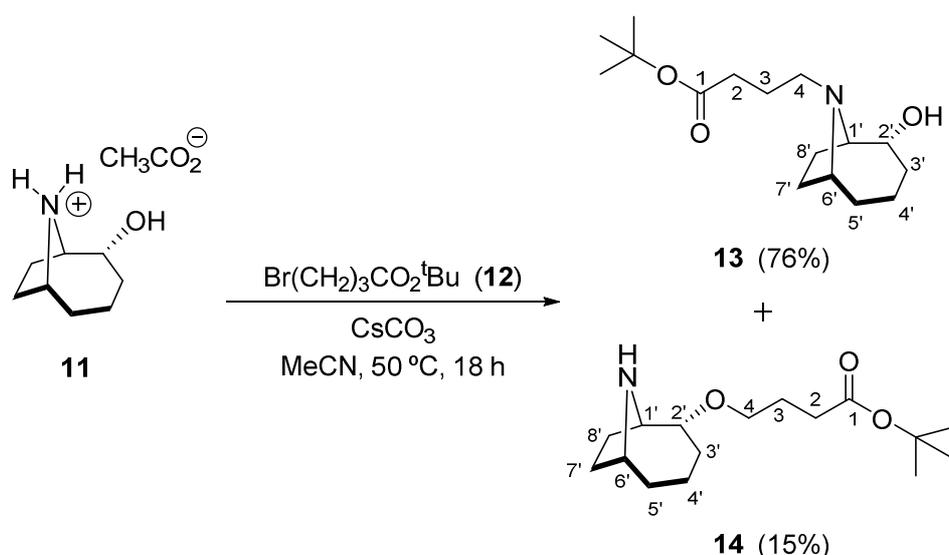
Ph), 70.15 (C-5), 68.6 (C-2), 56.5 (CH<sub>2</sub>Ph), 54.4 (C-1), 52.2 (C-6), 29.9 (C-3), 26.7 (C-4), 21.9 (C-7), 21.50 (Me), 19.3 (C-8).

### 5.2.1.2 Síntesis del hapteno AN $\eta$



Acetato de *rac*-(1*R*\*,2*R*\*,6*R*\*)-2-hidroxi-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-9-io (11). Una mezcla del alcohol azabicyclico **9** (377.0 mg, 1.632 mmol) y 256 mg) de 10% Pd/C (con 50% de humedad) en 10.2 mL de AcOH glacial se purga con H<sub>2</sub> y la suspensión resultante se mantiene con agitación bajo una presión de H<sub>2</sub> de 55 psi durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtra sobre celite, lavando con MeOH y se concentra. El exceso de AcOH se elimina azeotrópicamente por repetidas adiciones de CCl<sub>4</sub> y concentración a vacío, para obtener un aceite de color ocre correspondiente a la sal de amonio del amino-alcohol **11** (312 mg, 95%).

**Datos espectroscópicos de 11:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3250m (ancha), 2943m, 1703d, 1632m, 1557f, 1403f, 1264m, 1068m; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.35 (1H, s ancho, NH), 4.05 (3H, m, H-1, H-2, H-6), 2.28–1.58 (4H, m, H-3, H-5), 2.28 (2H, m, H-8), 2.07 (2H, m, H-7), 1.98 (3H, s ancho, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), 1.74–1.58 (2H, m, H-4); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>Cl)  $\delta$  177.4 (MeCO<sub>2</sub>H), 69.0 (C-2), 61.3 (C-1), 56.1 (C-6), 32.1 (C-7), 31.4 (C-3), 31.4 (C-5), 22.2 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), 21.9 (C-8), 18.4 (C-4); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO [M-CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 142.1226, encontrada 142.1224.

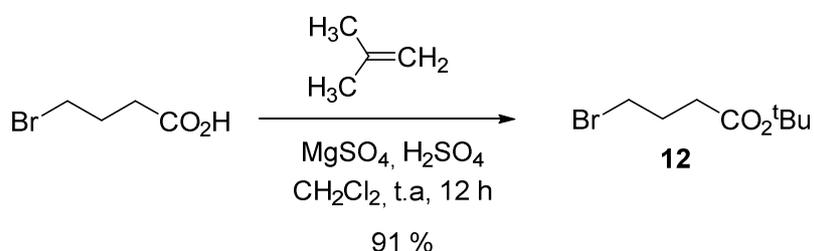


*rac*-4-((1*R*\*,2*R*\*,6*R*\*)-2-Hidroxi-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-9-il)butanoato de *terc*-butilo (13). Se prepara una disolución bajo atmosfera de N<sub>2</sub> a partir de 43 mg (0.213

mmol) de la sal de acetato del alcohol **11**, 3.0 equivalentes (208.5 mg, 0.640 mmol) de  $\text{CsCO}_3$  y 2.5 equivalentes (119 mg, 0.532 mmol) del bromuro del éster *terc*-butílico **12** en 1.5 mL de acetonitrilo anhidro. La mezcla de reacción resultante se mantiene con agitación a 50 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se diluye en agua y se lava con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x20 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El residuo resultante obtenido después de la evaporación del disolvente, se purifica por cromatografía en columna de sílice, empleando una mezcla  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (9:1) como eluyente, para obtener el amino-alcohol *N*-alquilado **13** como un aceite incoloro (46 mg, 76%). Luego, conservando la polaridad de la mezcla eluyente el producto resultante de fracciones más polares se corresponden al amino-alcohol *O*-alquilado **14** como un aceite incoloro (9.0 mg, 15%).

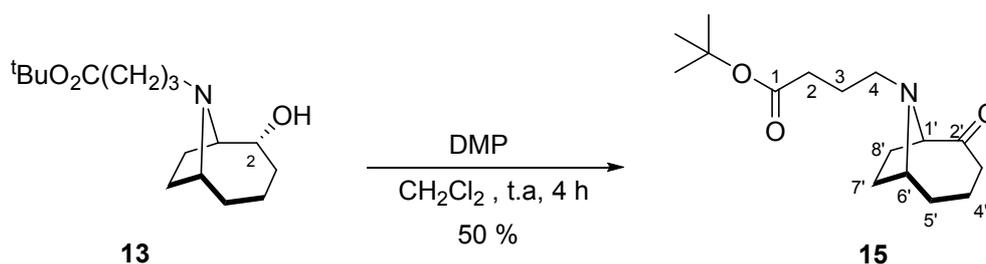
**Datos espectroscópicos de 13:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3373d (ancha), 2928m, 1727m, 1454d, 1392d, 1366m, 1254m, 1151f, 1052m, 847d;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.91 (1H, ddd,  $J = 9.2, 9.2, 8.8$  Hz, H-2'), 3.32 (2H, m, H-1' y H-6'), 2.58 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-4,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 2.29 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-2,  $\text{CH}_2\text{-CO}_2^t\text{Bu}$ ), 2.14–1.45 (2H, m, H-7'), 1.89–1.25 (2H, m, H-3'), 1.88–1.75 (2H, m, H-3), 1.70 (2H, m, H-8'), 1.50 (2H, m, H-4'), 1.42 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta$  173.3 (C-1, C=O), 80.3 ( $\text{CMe}_3$ ), 72.9 (C-2'), 69.1 (C-1'), 62.2 (C-6'), 55.5 (C-4), 35.1 (C-2), 33.1 (C-8'), 32.6 (C-7'), 32.1 (C-3'), 28.3 ( $\text{CMe}_3$ ), 24.8 (C-5'), 22.2 (C-3), 19.8 (C-4'); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  284.2220, encontrada 284.2209.

**Datos espectroscópicos de 14:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mezcla de epímeros en C-2', 1:1) 4.34–4.29 (H, m, H-1'), 4.26–4.20 (1H, m, H-6'), 4.11–4.05 (2H, m, H-4), 4.05–3.92 (1H, m, H-2'), 2.33–2.25 (2H, m, H-2), 2.25–2.20 (2H, m, H-8'), 2.10–2.01 (3H, m, H-7', H-3'), 1.96–1.85 (2H, m, H-3), 1.96–1.76 (3H, m, H-4', H-3'), 1.66–1.55 (2H, m, H-5'), 1.44 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta$  172.4 (C-1, C=O), 80.6 ( $\text{CMe}_3$ ), 71.5 (C-2'), 64.2 (C-4), 60.6 (C-1'), 54.3 (C-6'), 34.4 (C-2), 33.6 (C-8'), 32.6 (C-7'), 32.3 (C-3'), 24.8 (C-5'), 22.5 (C-3), 19.7 (C-4'). **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  284.2220, encontrada 284.2219.



**4-Bromobutanoato de *terc*-butilo (12).** A una suspensión agitada conteniendo 5.0 g (29.94 mmol) del ácido 4-bromobutanoico comercial y 3.71 gr de  $\text{MgSO}_4$  anhidro en 19.15 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, se adicionan 4 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. La mezcla resultante se enfría a -20 °C, se adicionan 8.35 mL (109.8 mmol) de

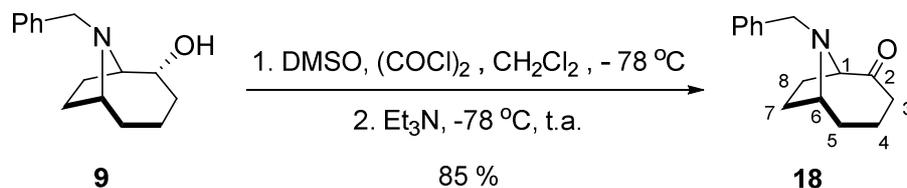
isobuteno líquido y se sella herméticamente el matraz de reacción. La reacción se deja avanzar durante 12 h con agitación a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo indicado, la mezcla de reacción se enfría a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de su apertura, se abre el matraz y se deja evaporar el exceso de isobuteno, se filtra la mezcla de reacción a vacío, lavando el  $\text{MgSO}_4$  con  $\text{AcOEt}$ . El filtrado, se lava sucesivamente con una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  5% y salmuera y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Filtración y evaporación del disolvente a presión reducida proporciona el éster *terc*-butílico  $\gamma$ -bromado **12** como un aceite incoloro (6.0 g, 91%). Las propiedades espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las descritas en la bibliografía.<sup>154</sup>



*rac*-4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Oxo-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-9-il)butanoato de *terc*-butilo (**15**). A una disolución de 2.0 equivalentes (275 mg, 0.65mmol) del reactivo de Dess-Martin Periodinano (DMP) en 5.0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro mantenida bajo atmosfera de  $\text{N}_2$  con agitación a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se adiciona una disolución de 92 mg (0.325 mol) del alcohol **13** en 5.0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro. La mezcla se agita durante 4 h a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se para la reacción por adición de 3.6 mL de disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y 3.6 mL de disolución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , la mezcla se agita a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min adicionales. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluye con 15 mL de agua, se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL) y las fases orgánicas resultantes se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. Después de la evaporación del disolvente, se obtiene un aceite amarillo claro que se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH en proporción 9:1, para obtener, en orden de elución, la cetona *N*-alquilada **15** como un aceite amarillo incoloro (46 mg, 50 %), seguido de 16.5 mg (18%) del alcohol de partida **13**.

**Datos espectroscópicos de 15:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2930d (ancha), 1727f, 1702m, 1454d, 1416d, 1366m, 1255d, 1152m;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.55–3.41 (2H, m, H-1' y H-6'), 2.83–2.73 (1H, m, H-3'), 2.58 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-4), 2.34–2.20 (4H, m, H-2, H-3', H-7'), 2.05 y 1.53 (2H, m, H-8'), 1.91 y 1.86 (2H, m, H-7' y H-5'), 1.76–1.68(2H, m, H-3), 1.66–1.53 (3H, m, H-4' y H-5'), 1.42 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta$  218.1 (C-2', C=O), 173.1 (C-1, C=O), 80.2 ( $\text{CMe}_3$ ), 73.5 (C-1'), 63.4 (C-6'), 53.0 (C-4), 42.5 (C-3'), 34.5 (C-5'), 33.1 (C-2), 30.0 (C-7'), 28.2 ( $\text{CMe}_3$ ), 27.0

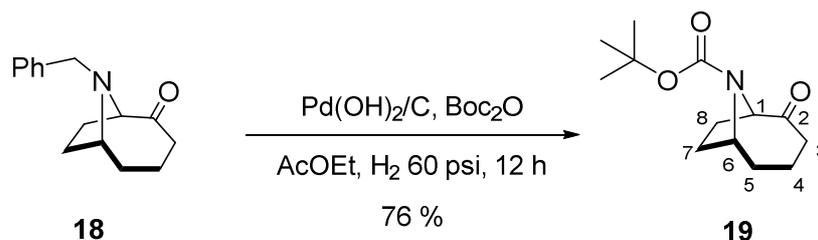
(C-8'), 25.0 (C-3), 19.9 (C-4'); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $C_{16}H_{28}NO_3$   $[M+H]^+$  282.2064, encontrada 282.2062.



***rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-9-Bencil-9-azabicyclo[4.2.1]nonan-2-ona (18).** A una disolución preparada bajo atmósfera de  $N_2$  a partir de 1.4 equivalentes de cloruro de oxalilo (256  $\mu\text{L}$ , 3.03 mmol) en 2.0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  enfriada a  $-78^\circ\text{C}$ , se adicionan gota a gota 2.8 equivalentes de DMSO seco (430  $\mu\text{L}$ , 6.06 mmol) disueltos en 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro. Se deja agitando 15 min para la activación del DMSO. Posteriormente, manteniendo la reacción a  $-78^\circ\text{C}$ , la mezcla de reacción anterior se adiciona sobre el alcohol de partida **9** (500 mg, 2.163 mmol) disuelto en 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  enfriado a  $-78^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se agita durante 30 min adicionales y se adicionan 6.0 equivalentes de  $\text{Et}_3\text{N}$  y se deja que la temperatura de la reacción suba lentamente hasta temperatura ambiente, manteniendo la reacción a esa temperatura durante aproximadamente 2 h. La reacción se sigue por CCF eluyendo con una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 9:1.

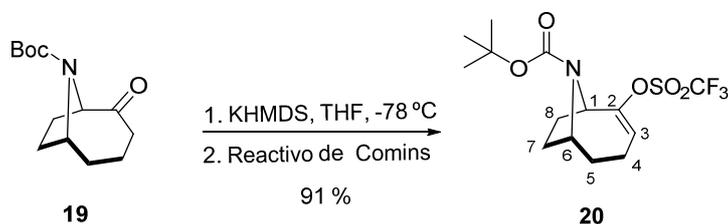
Terminada la reacción, esta se procesa por dilución con agua y extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con una solución saturada  $\text{NaHCO}_3$  y luego con salmuera; se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y el crudo de reacción obtenido tras haber evaporado el disolvente a presión reducida, se purifica por cromatografía en columna, utilizando  $\text{CHCl}_3$  como eluyente, para obtener la cetona **18** como un aceite ligeramente amarillo (421 mg, 85%). Las propiedades espectroscópicas de RMN para el compuesto **18** obtenido, coinciden con las reportadas previamente (CAS No. 105282-62-0).<sup>90</sup>

**Datos espectroscópicos de 18:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3026f, 2933f, 2361f, 2157f, 2040f, 1965f, 1706f, 1684f, 1260f, 1093f, 1028f, 800f, 699f;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.41–7.22 (5H, m Ph), 3.87–3.73 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.60–3.47 (2H, m, H-1 y H-6), 3.08–2.98 (2H, m, H-3), 2.39–1.90 (2H, m, H-8), 2.09–1.60 (2H, m, H-5), 1.94–1.58 (2H, m, H-7), 1.78–1.57 (2H, m, H-4).  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz)  $\delta$  218.1 (C-2, C=O), 140.0 (C-1' Ph), 128.4 (C-2' y C-6' Ph), 128.4 (C-3' y C-5' Ph), 127.2 (C-4' Ph), 73.4 (C-1), 63.6 (C-6), 58.9 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 42.5 (C-3), 35.4 (C-7), 30.4 (C-8), 26.8 (C-5), 20.0 (C-4); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $C_{15}H_{20}NO$   $[M+H]^+$  230.1539, encontrada 230.1538.



***rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-Oxo-9-azabicyclo[4.2.1]nonano-9-carboxilato de *tert*-butilo (19).** Una mezcla de 300 mg (1.308 mmol) de la bencilcetona **18**, 57 mg de 20% Pd(OH)<sub>2</sub> sobre carbono (50% de humedad) y 1.12 equivalente (320 mg, 1.465 mmol) de carbonato de di-*tert*-butilo en 3.2 mL de AcOEt se mantiene con agitación constante bajo una presión 60 psi de H<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido éste tiempo, la mezcla se filtra sobre celite, diluyendo con AcOEt. El filtrado se lava con 20 mL de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera y se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El residuo resultante de la evaporación del disolvente se purifica mediante cromatografía de gel de sílice, empleando hexano-AcOEt 9:1 como eluyente, para obtener la cetona *N*-Boc protegida **19** como un aceite incoloro que solidifica a -20 °C (238 mg, 76%). El producto **19** se ha descrito con anterioridad (CAS No. 353461-15-1) y los datos espectroscópicos encontrados se corresponden con los descritos.<sup>143</sup>

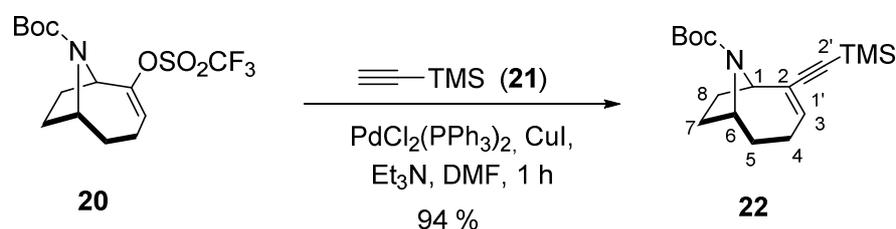
**Datos espectroscópicos de 19:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2967d (ancha), 2931d, 1709m, 1687f, 1392f, 1343m, 1168m, 1102f. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (2 rotámetros en proporción 2:1; se dan sólo las señales del mayoritario)  $\delta$  4.58-4.18 (2H, m, H-1 y H-6), 2.59-2.47 (1H, m, H-3), 2.40-2.25 (2H, m, H'-3 y H-7), 2.25-2.06 (2H, m, H-5 y H-8), 1.96-1.86 (1H, m, H'-7), 1.81-1.62 (4H, m, H-4, H'-5, H'-8), 1.42 (9H, s, CMe<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  215.4 (C-2, C=O), 153.1 (C=O Boc) 80.4 (CMe<sub>3</sub>), 65.1 (C-6), 56.6 (C-1), 41.8 (C-3), 33.0 (C-5), 30.0 (C-7), 28.5 (CMe<sub>3</sub>), 26.9 (C-8), 19.4 (C-4); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 240.1594, encontrada 240.1587.



***rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-(((Trifluorometil)sulfonyl)oxi)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-9-carboxilato de *tert*-butilo (20).** En un matraz se prepara una disolución con 123 mg (0.514 mmol) de la cetona **19** en 6.65 mL de THF anhidro bajo atmosfera inerte. La disolución se enfría a -78 °C y se adicionan gota a gota 2.0 equivalentes (2.05 mL, 1.027 mmol) de *bis*(trimetilsilil)amida potásica (KHMDS) 0.5 M en tolueno; la reacción se deja avanzar durante 1.5 h y posteriormente se adicionan 2.5 equivalentes (504

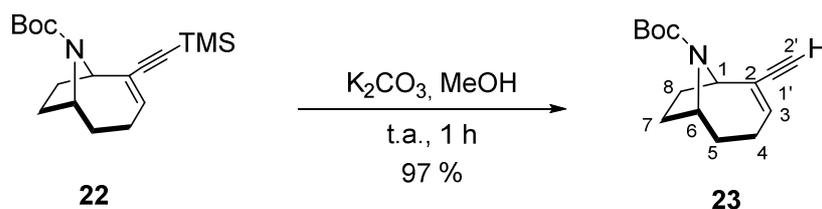
mg, 1.284 mmol) de disolución de *N*-(5-cloro-2-piridinil)*bis*(trifluorometanosulfonamida) (reactivo de Comins) disueltos en 0.4 mL de THF anhidro. Esta mezcla se agita durante 1 h adicional manteniendo la temperatura de reacción a -78 °C. Para finalizar, se adicionan 2 mL de una disolución saturada de cloruro amónico a 0 °C, la mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con AcOEt (3x15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente hexano-AcOEt 9:1, para obtener el enol triflato **20** como un aceite incoloro (174.0 mg, 91%).

**Datos espectroscópicos de 20:** IR (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2972d, 1679f, 1455d, 1400f, 1366f, 1243m, 1201f, 1168f, 1138f, 1072m, 884m. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (2 rotámetros en proporción 3:1, se dan sólo las señales del mayoritario)  $\delta$  5.79-5.72 (1H, m, H-3), 4.55 (1H, m, H-1), 4.44-4.23 (1H, m, H-6), 2.21(2H, m, H-4), 2.20-1.64 (2H, m, H-5), 2.06 (2H, m, H-8), 2.04-1.67(2H, m, H-7), 1.44 (9H, s, CMe<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  154.6 (C-2), 153.1 (C=O Boc), 120.5 (C-3), 116.5 (CF<sub>3</sub>), 80.5 (CMe<sub>3</sub>), 58.9 (C-1), 54.9 (C-6), 32.4 (C-7), 31.0 (C-8), 30.5 (C-5), 28.3 (CMe<sub>3</sub>), 19.7 (C-4); <sup>19</sup>F-RMN (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ -74.4 (s); EMAR (ES) *m/z* calculada para C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 372.1009, encontrada 372.1014.



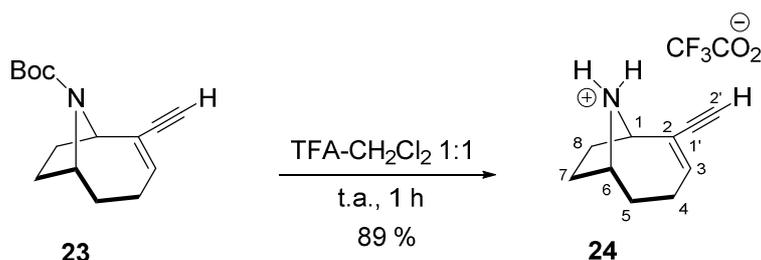
*rac*-(1*R*,6*R*)-2-((Trimetilsilil)etnil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-9 carboxilato de *terc*-butilo (**22**). 4.0 equivalentes (655  $\mu$ L, 4.64 mmol) de trimetilsililacetileno se adicionan a una mezcla preparada a partir de 430 mg (1.16 mmol) del enol triflato **20**, 81.4 mg (0.116 mmol, 10% mol) de PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 11.0 mg (0.06 mmol, 5% mol) de CuI bajo atmosfera inerte en 6.2 mL de DMF anhidra. La disolución resultante se desgasifica por sonicación bajo una corriente de nitrógeno, se adicionan 484  $\mu$ L (3.48 mmol, 3 equivalentes) de Et<sub>3</sub>N y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h a temperatura ambiente. Al comprobar el término de la reacción por CCF (hexano-AcOEt, 8:2), la mezcla de reacción se diluye con 10 mL de agua y se extrae con Et<sub>2</sub>O (3x15 mL), las fases orgánicas reunidas se lavan con disolución de LiCl al 1.5%, salmuera y se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se purifica por cromatografía en columna de sílice, empleando hexano-AcOEt 8:2 como eluyente, para obtener el enino conjugado **22** como un aceite incoloro (348 mg, 94%).

**Datos espectroscópicos de 22:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (2 rotámeros en proporción 4:1; se dan sólo las señales del mayoritario)  $\delta$  6.12 (1H, m, H-3), 4.58 (1H, m, H-1), 4.42–4.10 (1H, m, H-6), 2.26–2.14 (2H, m, H-4), 2.20–1.89 (2H, m, H-7), 2.15–1.63 (2H, m, H-8), 2.12–1.70 (2H, m, H-5), 1.47 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ ), 0.16 (9H, s,  $\text{SiMe}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta$  153.4 (C=O), 138.0 (C-3), 131.7 (C-2), 106.6 (C-1'), 92.6 (C-2'), 79.6 ( $\text{CMe}_3$ ), 59.8 (C-1), 55.6 (C-6), 31.4 (C-7), 31.3 (C-8), 28.8 (C-5), 28.6 ( $\text{CMe}_3$ ), 24.3 (C-4), 0.15 ( $\text{SiMe}_3$ ). **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_2\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  320.2040, encontrada 320.2042.



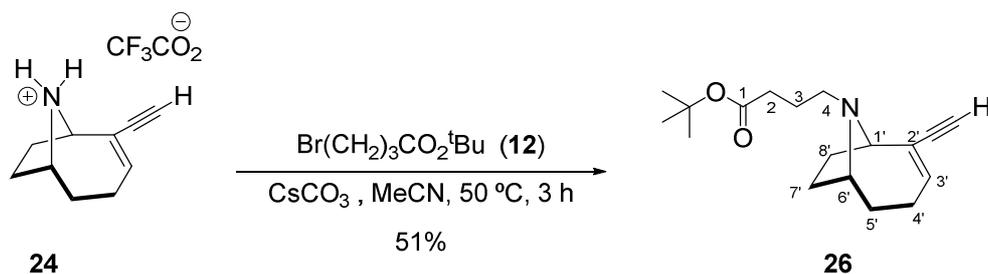
***rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-Etínil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene-9-carboxilato de *terc*-butilo (23).** Una mezcla formada a partir de 254 mg (0.795 mmol) del enino trimetilsililado **22**, 5.0 equivalentes (550 mg, 3.978 mmol) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro en 10 mL de MeOH, se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , controlando su evolución por CCF (usando como eluyente hexano–AcOEt en proporción 8:2). Después de 1 h, la mezcla de reacción se diluye con 30 mL de agua y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x25 mL), las fases orgánicas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. Después de evaporar el disolvente se obtiene el enino conjugado **23** como un aceite amarillo claro, prácticamente puro por  $^1\text{H}$  RMN, que no requirió purificación posterior (190 mg, 97%).

**Datos espectroscópicos de 23:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2973d, 2928d, 1685f, 1404f, 1362f, 1248m, 1168f, 1106m, 1007d, 934d, 852d;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se describe mayoritario)  $\delta$  6.16 (1H, dd,  $J = 6.1, 6.1$  Hz, H-3), 4.59 (1H, m, H-1), 4.40–4.18 (1H, m, H-6), 2.89 (1H, s, H-2'), 2.25 (2H, m, H-4), 2.20–2.12 (3H, m, H-5, H-7, H-8), 1.92–1.81 (1H, m, H'-7), 1.71–1.60 (2H, m, H'-5, H'-8), 1.46 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta$  155.6 (C=O), 138.3 (C-3), 130.1 (C-2), 85.0 (C-1'), 79.7 ( $\text{CMe}_3$ ), 76.0 (C-2'), 60.0 (C-1), 55.6 (C-6), 31.8 (C-8), 31.2 (C-7), 29.2 (C-5), 28.6 ( $\text{CMe}_3$ ), 24.2 (C-4); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  248.1645, encontrada 248.1645.



Trifluoroacetato de *rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-etinil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-io (**24**). Se prepara una disolución a partir de 0.5 mL de ácido trifluoroacético recién destilado en 0.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, la cual se adiciona bajo atmosfera inerte a 31.0 mg (0.125 mmol) del enino **23**. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente se elimina el disolvente exceso de ácido a presión reducida para obtener un residuo aceitoso marrónáceo correspondiente a la sal con el ácido trifluoroacético del aza-biciclo-enino conjugado **24** (23.5 mg, 89%) que sin etapa posterior de purificación se llevó directamente a la siguiente etapa de reacción.

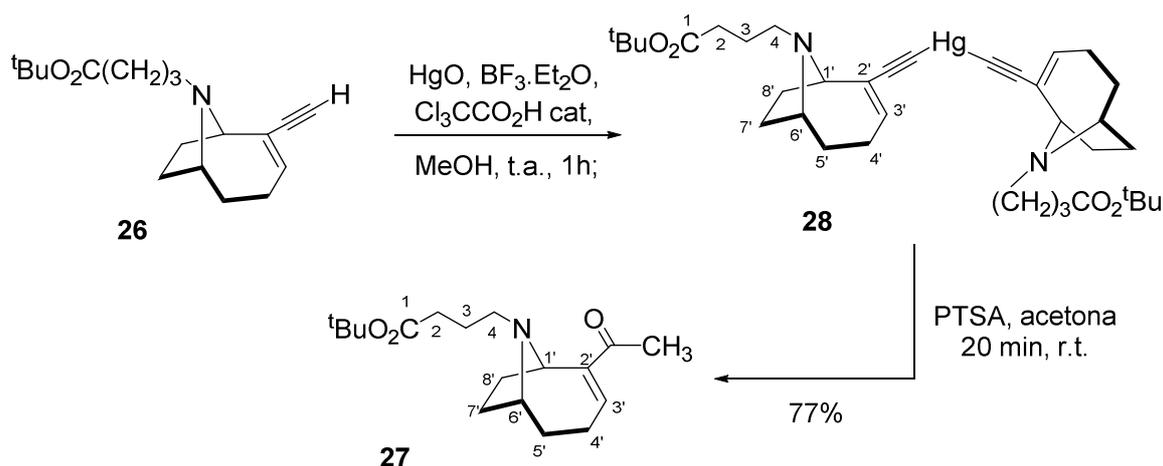
**Datos espectroscópicos de 24:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.43 (1H, m, H-3), 4.38 (2H, m, H-1), 4.28 (1H, m, H-6), 3.0 (1H, s, H-2'), 2.45–1.77 (8H, m, H-5, H-8, H-7, H-4). <sup>19</sup>F-RMN (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -76.4.



*rac*-4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Etinil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)butanoato de *terc*-butilo (**26**). Se prepara una disolución a partir de 81.0 mg (0.419 mmol) de la sal del alquino **24**, 3.0 equivalentes (1.26 mmol) de CsCO<sub>3</sub> y 2.5 equivalentes (1.04 mmol) del bromuro del éster *terc*-butílico **12** en 1.5 mL de acetonitrilo anhidro bajo atmosfera de N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción resultante se agita a 50 °C durante 3 h y al término de la reacción, ésta se diluye en agua y solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>; se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x20 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El residuo resultante después de la evaporación del disolvente se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando CHCl<sub>3</sub>-MeOH 9:1 como eluyente, para obtener el alquino *N*-alquilado **26** como un aceite de color ligeramente amarillo (61.0 mg, 51%).

**Datos espectroscópicos de 26:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3294.9d, 2973.0d, 2927.7d, 1725.78f, 1421.5d, 1365.77m, 1254.93m, 1149.42f, 951.38d, 845.4d; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 6:1; se describe mayoritario) δ 6.25 (1H, ddd, *J* = 8.2, 8.2, 0.6 Hz, H-3'), 3.80 (1H, m, H-1'), 3.47 (1H, m, H-6'), 2.86

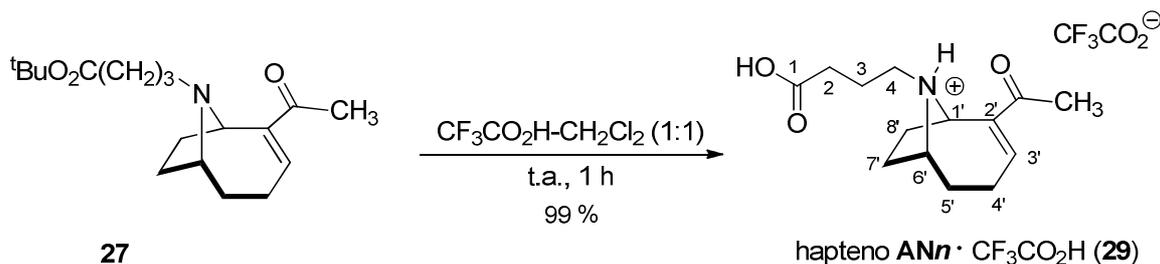
(1H, s, C≡C-H), 2.60 (2H, m, H-4), 2.36 y 1.80 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2.32–2.13 (2H, m, H-4'), 2.26 (2H, m, H-2), 2.23–2.15 (2H, m, H-5'), 2.06 y 1.64 (2H, m, H-7' y H'-7'), 1.80 (2H, m, H-3), 1.44 (9H, s, CMe<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>Cl) δ 173.3 (C-1), 138.9 (C-3'), 129.1 (C-2'), 86.8 (C≡CH), 80.1 (CMe<sub>3</sub>), 75.4 (C≡CH), 64.4 (C-1'), 60.5 (C-6'), 46.4 (C-4), 33.9 (C-2), 31.5 (C-8'), 28.3 (C-7'), 28.2 (CMe<sub>3</sub>), 25.24 (C-5'), 24.54 (C-4'), 23.84 (C-3); EMAR (ES) *m/z* calculada para C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 290.2115 encontrada 290.2119.



*rac*-4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)butanoato de *tert*-butilo (**27**). 4.6 mL de una disolución preparada a partir de 2 mg de ácido tricloroacético y 50 µL de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O en 10 mL de MeOH anhidro se adicionaron, bajo atmosfera inerte, sobre una disolución del alquino **26** (170.0 mg, 0.587 mmol) y 0.5 equivalentes de HgO (63.7 mg, 0.293 mmol) en 2.4 mL de MeOH anhidro. La mezcla de reacción resultante se agita a temperatura ambiente, controlando la misma por CCF (CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 9-1), hasta su finalización. Al cabo de aproximadamente 1 h, la mezcla de reacción se vierte sobre 15 mL de agua fría y 5 mL de disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x15 mL) y las fases orgánicas se lavan con salmuera y se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. Tras eliminación del disolvente se obtiene un aceite amarillo, correspondiente al organomercurio intermedio **28**, que directamente se somete a hidrólisis ácida empleando 1.5 equivalentes (167.2 mg, 0.88 mmol) de ácido *p*-toluenosulfónico (PTSA·H<sub>2</sub>O) en 3 mL de acetona; la reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, la mezcla de reacción se procesa por dilución con 10 mL de H<sub>2</sub>O y 5 mL de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La eliminación del disolvente a presión reducida proporciona un residuo aceitoso ligeramente marrón que se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente CHCl<sub>3</sub> con 0.5% de Et<sub>3</sub>N, para obtener la anatoxina-a *N*-alquilada **27** como un aceite incoloro (139 mg, 77%).

**Datos espectroscópicos de 27:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.92 (1H, m, H-3'), 4.52 (1H, aparente d,  $J = 10.6$  Hz, H-1'), 3.49 (1H, m, H-6'), 2.48-2.35 (2H, m, H-4), 2.43-2.35 (2H, m, H-4'), 2.27 (3H, s, Me), 2.31 y 1.86 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2.10 y 1.63 (2H, m, H-7' y H'-7'), 2.23-2.17 (2H, m, H-2), 1.85-1.72 (2H, m, H-5') 1.73-1.63 (2H, m, H-3), 1.41 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  199.2 ( $\text{COMe}$ ), 173.2 ( $\text{CO}_2$ ), 148.6 (C-2'), 143.2 (C-3'), 80.0 ( $\text{CMe}_3$ ), 60.6 (C-6'), 56.7 (C-1'), 48.1 (C-4), 33.7 (C-2), 31.3 (C-8'), 28.6 (C-7'), 28.2 ( $\text{CMe}_3$ ), 25.6 ( $\text{MeCO}$ ), 25.5 (C-5'), 25.0 (C-4'), 24.2 (C-3); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  308.2220 encontrada 308.2234.

**Datos espectroscópicos de 28.**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.22 (1H, m, H-3'), 3.84 (1H, m, H-1'), 3.51 (1H, m, H-6'), 2.68-2.57 (2H, m, H-4), 2.38-2.17 (2H, m, H-4'), 2.26 (2H, m, H-8'), 2.25 (2H, m, H-2), 2.08 y 1.64 (2H, m, H-7' y H'-7'), 1.89-1.72 (2H, m, H-5'), 1.80 (2H, m, H-3), 1.44 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.1 ( $\text{CO}_2$ , C-1), 138.7 (C-3'), 129.5 (C-2'), 119.0 ( $\text{C}\equiv\text{C-Hg}$ ), 108.9 ( $\text{C}\equiv\text{C-Hg}$ ), 80.1 ( $\text{CMe}_3$ ), 64.9 (C-1'), 59.8 (C-6'), 46.4 (C-4), 33.9 (C-2), 31.4 (C-8'), 28.3 (C-7'), 28.2 ( $\text{CMe}_3$ ), 25.4 (C-4'), 24.5 (C-5'), 23.8 (C-3); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{HgN}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  779.3706 encontrada 779.3733.

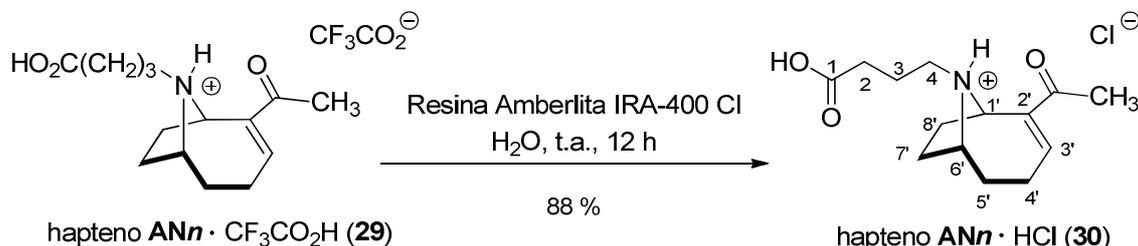


2,2,2-Trifluoroacetato de *rac*-4-(1*R*\*,6*R*\*)-2-acetil-9-(3-carboxipropil)-azabiciclo[4.2.1]non-2-en-9-io (Hapteno  $\text{AN}_n$ , 29). 30.5 mg (99.0  $\mu\text{mol}$ ) del éster *terc*-butílico 27 se tratan con 1 mL de una mezcla 1:1 de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H-CH}_2\text{Cl}_2$ . La disolución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Al finalizar la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida hasta sequedad, obteniendo el hapteno  $\text{AN}_n$  (29) en forma de sal del ácido trifluoroacético como un aceite incoloro (36 mg, 99%).

**Datos espectroscópicos de 29:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2915.9d, 2848.3d, 1669.1f, 1418.4d, 1198.0m, 1132.8m, 754d;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.50 (1H, m, H-3'), 5.19 (1H, aparente t,  $J = 11.5$  Hz, H-1'), 4.22 (1H, m, H-6'), 3.16 (2H, m, H-4), 2.65-2.55 (2H, m, H-4'), 2.47 (2H, m, H-2), 2.35 (3H, s, Me), 2.23 y 2.03 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2.19 y 1.85 (2H, m, H-7' y H'-7'), 2.03 (2H, m, H-3), 1.89-1.79 (2H, m, H-5);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.0 ( $\text{COMe}$ ), 176.0 ( $\text{CO}_2$ ), 161.4 ( $\text{F}_3\text{C-CO}_2^-$ ),<sup>xix</sup> 149.0 (C-2'),

<sup>xix</sup> La señal correspondiente al átomo de carbono del grupo  $\text{CF}_3$  no se observa en el espectro de carbono al nivel de acumulación realizado.

148.0 (C-3'), 64.3 (C-6'), 57.0 (C-1'), 49.0 (C-4), 32.9 (C-2), 32.9 (C-8'), 29.3 (C-7'), 26.8 (C-5'), 25.4 (Me), 23.5 (C-4'), 20.7 (C-3);  $^{19}\text{F}$ -RMN (282 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -77.73; EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  252.1594, encontrada 252.1596.

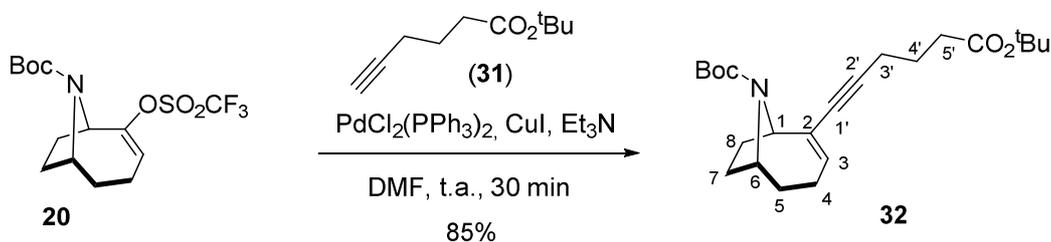


Clorhidrato del ácido *rac*-4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)butanoico (Clorhidrato del hapteno ANn, **30**). 80 mg de resina amberlita IRA-400, previamente acondicionada,<sup>190,191,192</sup> se adicionan a una disolución preparada a partir de 36 mg (0.098 mmol) de la sal del ácido trifluoroacético del hapteno ANn (**29**) en 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y la suspensión se deja con agitación suave durante una noche. La mezcla de reacción se filtra para separar la resina y el filtrado acuoso se liofiliza para obtener un sólido espumoso muy higroscópico correspondiente al clorhidrato del hapteno ANn (**30**) (24.9mg, 88%).

**Datos espectroscópicos de 30:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33 (1H, aparente t,  $J$  = 5.9 Hz, H-3'), 5.13 (1H, aparente d,  $J$  = 7.9 Hz, H-1'), 4.14 (1H, m, H-6'), 3.01 (2H, m, H-4), 2.59 (2H, m, H-4'), 2.42 (2H, m, H-2), 2.42 y 1.96 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2.35 (3H, s, Me), 2.32 y 1.96 (2H, m, H-7' y H'-7'), 1.96 (2H, m, H-3), 1.81-1.72 (2H, m, H-5');  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.0 (COMe), 176.0 ( $\text{CO}_2$ ), 149.0 (C-2'), 148.0 (C-3'), 64.3 (C-6'), 57.0 (C-1'), 49.0 (C-4), 33.0 (C-2), 32.9 (C-8'), 29.3 (C-7'), 26.8 (C-5'), 25.4 (Me), 23.5 (C-4'), 20.7 (C-3); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  252.1594, encontrada 252.1597.

### 5.2.1.3 Síntesis del hapteno ANm

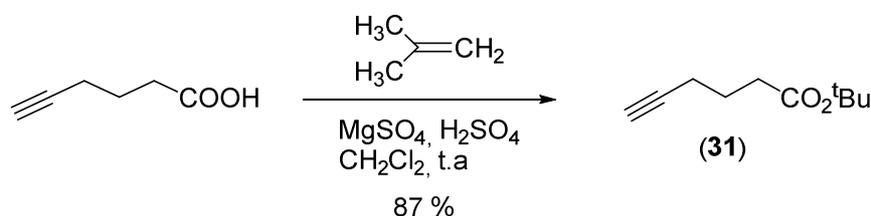
#### 5.2.1.3.1 Síntesis del clorhidrato del Hapteno ANm



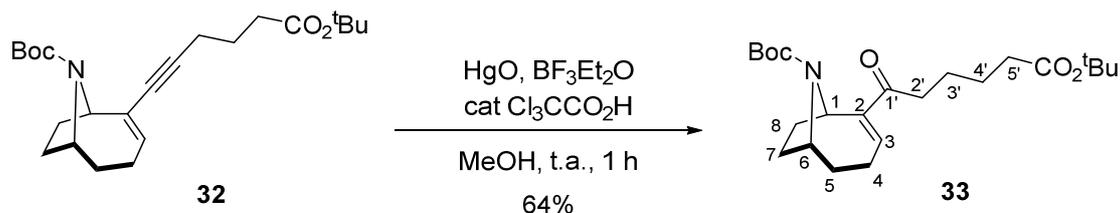
*rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-(6-(*tert*-butoxi)-6-oxohex-1-in-1-il)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (**32**). A una mezcla preparada a partir de 126 mg (0.34 mmol) del enol triflato **20**, 23.9 mg (10% mol, 0.034 mmol) de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  y 3.3 mg (5% mol, 0.017 mmol) de CuI bajo atmosfera de  $\text{N}_2$  se adicionan 360  $\mu\text{L}$  de DMF

anhidra y 1.5 equivalentes (85.8 mg, 0.51 mmol) del hex-5-inoato de *tert*-butilo (**31**). La disolución resultante se desgasifica por ciclos de vacío bajo una corriente de nitrógeno y se adicionan 3.0 equivalentes (142  $\mu$ L, 1.02 mmol) de Et<sub>3</sub>N. Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, se comprueba por CCF que el triflato de partida se ha consumido completamente. La mezcla de reacción se diluye con 10 mL de agua y se extrae con Et<sub>2</sub>O (3x15 mL); las fases orgánicas se lavan sucesivamente con disolución de LiCl al 1.5% y salmuera y se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando una mezcla de hexano en 5% de AcOEt como eluyente, para obtener el enino conjugado **32** como un aceite incoloro (112.6 mg, 85%).

**Datos espectroscópicos de 32:** IR (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2975d (ancha), 1728f, 1694f, 1479d, 1403m, 1366f, 1253d, 1151f, 1114d, 768d; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de 2 rotámetros en proporción 2:1)  $\delta$  5.98-5.94 (1H, m, H-3), 4.53 (1H, m, H-1), 4.39-4.13 (1H, m, H-6), 2.35-2.29 (4H, m, H-5' y H-4), 2.23-2.17 (2H, m, H-3'), 2.14-2.06 (4H, m, H-8, H-7), 1.81-1.75 (5H, m, H'-7, H-4', H-5), 1.44\* (9H, s, CO<sub>2</sub>CMe<sub>3</sub>), 1.42\* (9H, s, CMe<sub>3</sub> Boc); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.7 (CO<sub>2</sub>tBu), 153.6 (C=O, Boc), 135.1 (C-3), 131.0 (C-2), 87.7 (C-2'), 82.4 (C-1'), 80.3 (CMe<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>), 79.4 (CMe<sub>3</sub>, Boc), 60.5 (C-1), 55.2 (C-6), 32.2 (C-5'), 31.2 (C-7), 30.2 (C-8), 29.4 (C-5), 28.6\* (CMe<sub>3</sub>, Boc), 28.2\* (CO<sub>2</sub>CMe<sub>3</sub>), 24.0 (C-4'), 23.6 (C-4), 18.9 (C-3'); **EMAR (ES)** calculado para C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 389.2566, encontrada 389.2569.

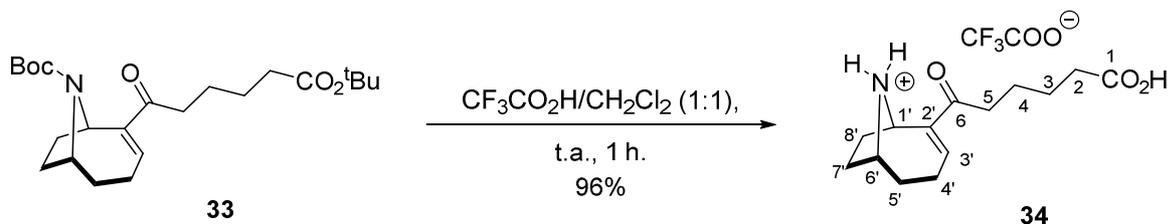


**Hex-5-inoato de *tert*-butilo (31).** A una suspensión en agitación, formada a partir de 5.0 g (44.6 mmol) del ácido hex-5-inoico comercial y 5.54 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro (12.6 mmol) en 28.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se adicionan 626  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado; la mezcla de reacción resultante se enfría a -20 °C y se adicionan 12.43 mL (137.4 mmol) de isobuteno. Acto seguido, el matraz de presión se sella y se mantiene la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se enfría a -15 °C para abrir el matraz y después se filtra a presión reducida, lavando el MgSO<sub>4</sub> con AcOEt. La fase orgánica filtrada se lava con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> 5 %, con disolución saturada de NaCl y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para proporcionar el éster *tert*-butílico **31** (6.6 g, 87%). El producto obtenido ha sido previamente descrito (CAS 73448-14-3) y las propiedades espectroscópicas coinciden con las descritas en la literatura.<sup>232</sup>



*rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-(6-(*tert*-Butoxi)-6-oxohexanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (**33**). A una disolución preparada a partir de 80 mg del alquino **32** (0.205 mmol) y 0.5 equivalentes de HgO (22.3 mg, 0.103 mmol) en 900  $\mu$ L de MeOH anhidro se adiciona gota a gota, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, 1.8 mL de una disolución preparada a partir de 2 mg de ácido tricloroacético y 50  $\mu$ L de BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O en 10 mL de MeOH anhidro. La mezcla de reacción resultante se agita a temperatura ambiente hasta desaparición del alquino, monitorizando la reacción por CCF, empleando hexano–AcOEt 7:3 como eluyente. Aproximadamente después de 1h, la mezcla de reacción se vierte sobre agua fría, se basicifica con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x15 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La evaporación del disolvente a vacío proporciona un aceite amarillo que se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente hexano–AcOEt 8:2, obteniéndose la enona conjugada **32** como un aceite ligeramente amarillo (54 mg, 64%).

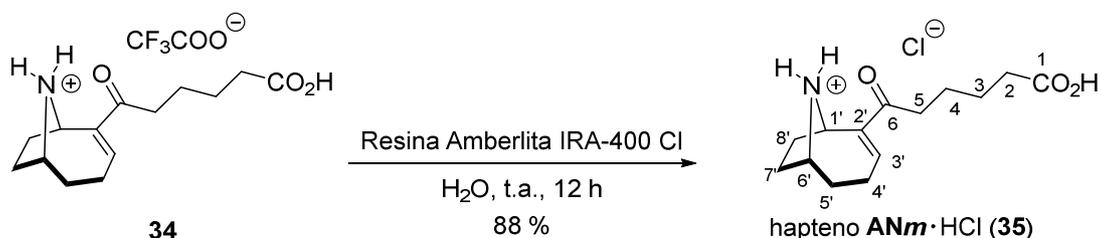
**Datos espectroscópicos de 32:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2974d (ancha), 2933d, 2160d, 1728m, 1693f, 1667m, 1392m, 1365m, 1253d, 1168m, 934d, 847d (ancha); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 4:1; se describe mayoritario)  $\delta$  6.80 (1H, m, H-3), 5.11 (1H, m, H-1), 4.37 (1H, m, H-6), 2.65 (2H, m, H-2'), 2.42 (2H, m, H-5'), 2.33 (3H, m, H-4', H-4), 2.17-2.07 (2H, m, H-8, H'-4), 1.65 (7H, m, H-3', H-5, H-7, H'-8), 1.43\* (9H, s, CO<sub>2</sub> CMe<sub>3</sub>), 1.36\* (9H, s, CMe<sub>3</sub>Boc); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  199.7 (C-1', C=O), 173.0 (C-6', CO<sub>2</sub><sup>t</sup>Bu), 153.3 (CO<sub>2</sub>, Boc), 150.0 (C-2), 141.0 (C-3), 80.2 (CO<sub>2</sub>CMe<sub>3</sub>), 79.4 (CMe<sub>3</sub>, Boc), 55.7 (C-6), 53.4 (C-1), 36.9 (C-5'), 35.5(C-2'), 31.7 (C-8), 30.6 (C-7), 28.9 (C-5), 28.6\* (CO<sub>2</sub>CMe<sub>3</sub>), 28.2\* (CMe<sub>3</sub>, Boc), 24.9 (C-3'), 24.4 (C-4'), 24.3 (C-4); **EMAR (ES)** calculado para C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 408.2744, encontrada 408.2738.



Sal del ácido trifluoroacético del ácido *rac*-6-((1*R*\*,6*R*\*)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)-6-oxohexanoico (trifluoroacetato del hapteno AN*m*, **34**). A 55.0 mg (0.135 mmol) del éster *tert*-butílico **33** se adiciona 1 mL de una disolución de CF<sub>3</sub>COOH–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

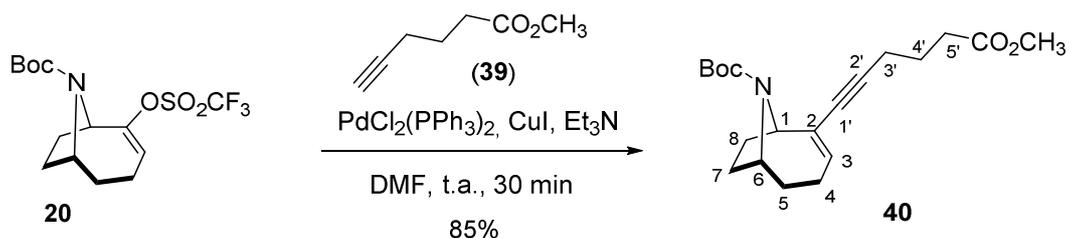
1:1 bajo atmósfera inerte de nitrógeno, y a temperatura ambiente se mantiene la disolución en agitación durante 1 h. Posteriormente, se evaporó azeotrópicamente a presión reducida el exceso de la mezcla ácida para obtener el hapteno AN*m* como sal derivada del ácido trifluoroacético **34** como un residuo aceitoso (47 mg, 96 %).

**Datos espectroscópicos de 34:** IR (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2974d (ancha), 2933d, 2160d, 1728m, 1693f, 1667m, 1392m, 1365m, 1253d, 1168m, 934d, 847d (ancha);  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.40-7.36 (1H, ddd,  $J = 8.4, 8.4, 1.0$  Hz, H-3'), 5.10 (1H, aparente d,  $J = 9.3$  Hz, H-1'), 4.25 (1H, m, H-6'), 2.76 (2H, m, H-5), 2.66 (2H, m, H-4'), 2.42 y 1.99 (2H, m, H-8 y H-8'), 2.31 (4H, m, H-2 y H-5'), 2.15 (2H, m, H-7'), 1.95 (2H, m, H-4), 1.63 (2H, m, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  200.1 (C-6, C=O), 177.8 (C-1,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 161.1 ( $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ), 147.8 (C-3'), 144.5 (C-2'), 60.3 (C-6'), 53.9 (C-1'), 37.3 (C-5), 35.0 (C-2), 31.3 (C-8'), 28.9 (C-4), 28.2 (C-7'), 25.6 (C-5'), 25.2 (C-3), 24.3 (C-4);  $^{19}\text{F-RMN}$  (282 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -76.8; **EMAR (ES)** calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  252.1594, encontrada 252.1596.



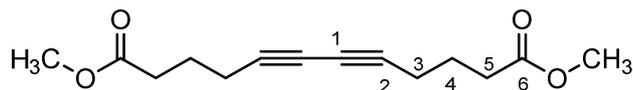
Clorhidrato del ácido *rac*-6-((1*R*\*,6*R*\*)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)-6-oxohexanoico (Clorhidrato del hapteno AN*m*, **35**). 85 mg de resina amberlita IRA-400, previamente acondicionada, se adicionan a una disolución preparada a partir de 30 mg (0.104 mmol) de la sal del ácido trifluoroacético del hapteno AN*m* (**34**) en 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y la suspensión se deja con agitación suave durante una noche. La mezcla de reacción se filtra para separar la resina y el filtrado acuoso se liofiliza para obtener un sólido espumoso muy higroscópico correspondiente al clorhidrato del hapteno AN*m* (**35**) (26.3 mg, 88%).

**Datos espectroscópicos de 35:** IR (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2974d (ancha), 2933d, 2160d, 1728m, 1693f, 1667m, 1392m, 1365m, 1253d, 1168m, 934d, 847d (ancha);  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.40-7.36 (1H, ddd,  $J = 8.4, 8.4, 1.0$  Hz, H-3'), 5.10 (1H, aparente d,  $J = 9.3$  Hz, H-1'), 4.25 (1H, m, H-6'), 2.76 (2H, m, H-5), 2.66 (2H, m, H-4'), 2.42 y 1.99 (2H, m, H-8 y H-8'), 2.31 (4H, m, H-2 y H-5'), 2.15 (2H, m, H-7'), 1.95 (2H, m, H-4), 1.63 (2H, m, H-3);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  200.1 (C-6, C=O), 177.8 (C-1,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 161.1 ( $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ), 147.8 (C-3'), 144.5 (C-2'), 60.3 (C-6'), 53.9 (C-1'), 37.3 (C-5), 35.0 (C-2), 31.3 (C-8'), 28.9 (C-4), 28.2 (C-7'), 25.6 (C-5'), 25.2 (C-3), 24.3 (C-4); **EMAR (ES)** calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  252.1594, encontrada 252.1596.

5.2.1.3.2. Síntesis del trifluoroacetato del NHS éster del hapteno AN*m*

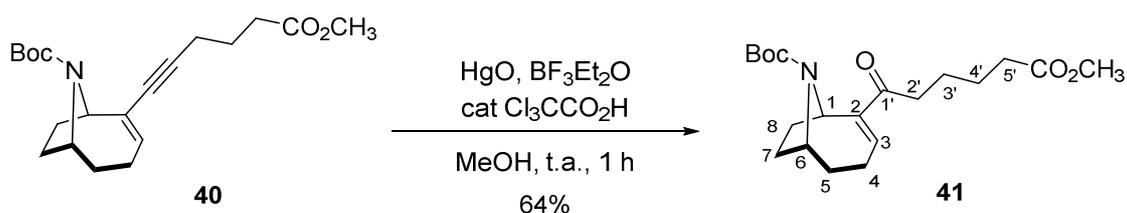
***rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-(6-Metoxi-6-oxohex-1-in-1-il)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de metilo (40).** A una mezcla preparada a partir de 108 mg (0.291 mmol) del enol triflato **20**, 20.4 mg (10% mol, 0.029 mmol) de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  y 2.7 mg (5% mol, 0.014 mmol) de CuI bajo atmosfera de  $\text{N}_2$  se adicionan 1.5 mL de DMF anhidra y 4.0 equivalentes (153  $\mu\text{L}$ , 1.167 mmol) de hex-5-inoato de metilo comercial (**39**). La disolución resultante se desgasifica por ciclos de vacío bajo una corriente de nitrógeno y se adicionan 3.0 equivalentes (122  $\mu\text{L}$ , 0.875 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$ . Después de 1 h de agitación a temperatura ambiente, se comprueba por CCF que el triflato de partida se ha consumido completamente. La mezcla de reacción se diluye con 10 mL de agua y se extrae con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x15 mL); las fases orgánicas se lavan sucesivamente con disolución de LiCl al 1.5% y salmuera y se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando hexano-AcOEt 9:1 como eluyente, para obtener en primer lugar el producto de homoacoplamiento del alquino (**40a**, 10.9 mg, 11%), seguido del enino conjugado **40** como un aceite incoloro (86.4mg, 85%).

**Datos espectroscópicos de 40:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2953.0d, 2400f, 2350f, 1733m, 1690m, 1402.5d, 1365.1 d, 1164.7 m;  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se dan sólo las señales del mayoritario)  $\delta$  5.94 (1H, dd,  $J = 11.6, 5.5$  Hz, H-3), 4.51 (1H, m, H-1), 4.39-4.13 (1H, m, H-6), 3.66 (3H, s,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 2.43 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-5'), 2.31 (2H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-3'), 2.25-2.18 (2H, m, H-4), 2.16-2.04 (3H, m, H-8, H-7), 1.83 (2H, dt,  $J = 6.8$  Hz, H-4'), 1.83-1.68 (3H, m, H-5, H'-7), 1.44 (9H, s,  $\text{CMe}_3$  Boc);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.1 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 153.6 (C=O Boc), 135.2 (C-3), 130.9 (C-2), 87.4 (C-2'), 82.6 (C-1'), 79.4 ( $\text{CMe}_3$  Boc), 60.5 (C-1), 55.1 (C-6), 51.7 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 32.9 (C-5'), 31.3 (C-7), 30.2 (C-8), 29.4 (C-5), 28.6 ( $\text{CMe}_3$  Boc), 24.1 (C-4'), 23.6 (C-4), 18.9 (C-3'). **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  348.2169, encontrada 348.2168.



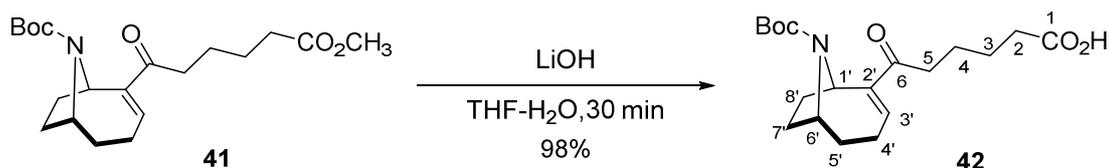
40a

**Datos espectroscópicos de 40a:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.67 (6H, s,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 2.44 (4H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-5), 2.31 (4H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-3), 1.83 (4H, dt,  $J = 6.8$  Hz, H-4);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  76.5 (C-2), 66.1 (C-1), 51.7 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 32.2 (C-5), 24.0 (C-4), 19.0 (C-3).



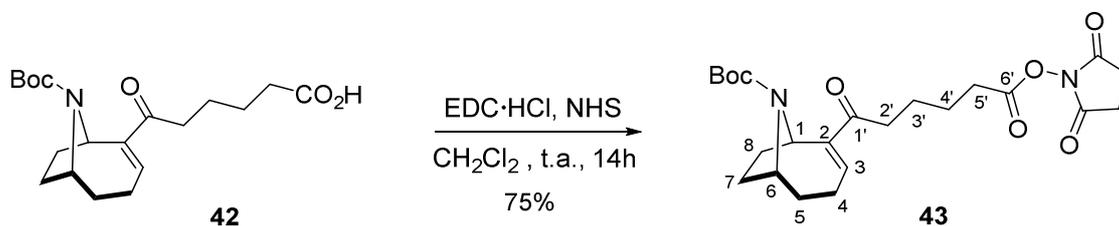
***rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-(6-Metoxi-6-oxohexanoil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de metilo (41).** A una disolución preparada a partir de 80 mg del alquino **40** (0.230 mmol) y 0.5 equivalentes de HgO (25 mg, 0.115 mmol) en 900  $\mu\text{L}$  de MeOH anhidro se adiciona gota a gota, bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , 1.8 mL de una disolución preparada a partir de 2 mg de ácido tricloroacético y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  en 10 mL de MeOH anhidro. La mezcla de reacción resultante se agita a temperatura ambiente hasta desaparición del alquino, monitorizando la reacción por CCF, empleando hexano-AcOEt 7:3 como eluyente. Aproximadamente después de 1h, la mezcla de reacción se vierte sobre agua fría, se basicifica con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La evaporación del disolvente a vacío proporciona un aceite amarillo que se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente hexano-AcOEt 8:2, obteniéndose la enona conjugada **41** como un aceite ligeramente amarillo (65 mg, 64%).

**Datos espectroscópicos de 41:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se dan sólo las señales del mayoritario)  $\delta$  6.79 (1H, m, H-3), 5.13 (1H, m, H-1), 4.42–4.28 (1H, m, H-6), 3.65 (3H, s,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 2.65 (2H, m, H-2'), 2.42 (2H, m, H-5'), 2.33 (3H, m, H-4', H-4), 2.17–2.07 (2H, m, H-8, H'-4), 1.65 (7H, m, H-3', H-5, H-7, H'-8), 1.39 (9H, s,  $\text{CMe}_3$  Boc);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  199.7 (C-1', C=O), 173.0 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 153.2 (C=O Boc), 150.0 (C-2), 141.1 (C-3), 79.4 ( $\text{CMe}_3$  Boc), 55.7 (C-6), 53.3 (C-1), 51.7 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 36.9 (C-5'), 35.5 (C-2'), 31.7 (C-8), 30.5 (C-7), 28.9 (C-5), 28.2 ( $\text{CMe}_3$  Boc), 24.9 (C-3'), 24.4 (C-4'), 24.3 (C-4); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  366.2275, encontrada 366.2274.



Ácido *rac*-6-((1*R*\*,6*R*\*)-9-(*tert*-butoxicarbonil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)-6-oxohexanoico (**42**). Se prepara una disolución de 97 mg (0.27 mmol) del éster metílico **41** en 2 mL de THF, se enfría en un baño de hielo y se añade gota a gota con agitación una disolución fría de 2 mL de una disolución acuosa 2.7 M (5.4 mmol, 10 equivalentes finales) de LiOH. Después agitar a temperatura ambiente durante 30 min., la mezcla de reacción se vierte sobre agua-hielo y se acidifica hasta pH 2-3 con una disolución acuosa 1 M de KHSO<sub>4</sub> fría. La mezcla se extra con AcOEt (3x15 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera y se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La eliminación del disolvente a vacío proporciona el ácido carboxílico **42** como un aceite incoloro (93 mg, 98%), que por RMN muestra estar prácticamente puro y por lo tanto se utiliza en la siguiente etapa sin purificación adicional.

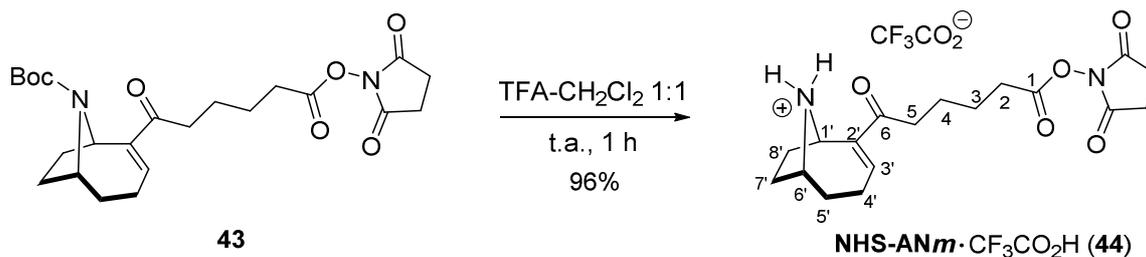
**Datos espectroscópicos de 42:** IR (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  2973d, 2931.6d, 2356.8f, 1662.4f, 1409m, 1365.1m, 1246.5d, 1216d, 1166.9m, 1115.8m, 931.7d, 750f; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (una mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se dan sólo las señales del mayoritario),  $\delta$  6.79 (1H, m, H-3'), 5.13 (1H, aparente d,  $J = 8.9$  Hz, H-1'), 4.44-4.25 (1H, m, H-6'), 2.65 (2H, m, H-5), 2.42 (5H, m, H-2, H-4', H-8'), 2.10 (4H, m, H-3, H'-8', H-7'), 1.65 (5H, m, H-4, H-5', H'-7'), 1.39 (9H, s, CMe<sub>3</sub> Boc); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  199.6 (C=O, C-6), 178.9 (CO<sub>2</sub>H), 157.6 (C=O Boc), 149.9 (C-2'), 141.2 (C-3'), 79.6 (CMe<sub>3</sub> Boc), 55.1 (C-6'), 53.3 (C-1'), 36.7 (C-5), 33.6 (C-2), 31.5 (C-8'), 31.1 (C-7'), 30.5 (C-4), 28.9 (C-5'), 28.5 (CMe<sub>3</sub> Boc), 24.5 (C-4'), 24.3 (C-3); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 352.2118, encontrada 352.2131.



*rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-(6-((2,5-Dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexanoil)-9-azabicyclo[4.2.1] non-2-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (**43**). Se prepara una disolución a partir de 80 mg (0.228 mmol) del ácido **42**, 1.5 equivalentes (39.3 mg, 0.341 mmol) de NHS y 1.5 equivalentes (65.4 mg, 0.341 mmol) de EDC·HCl en 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco bajo atmosfera de N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 17 h. Tras este tiempo se confirma por CCF, empleando cloroformo-acetona 9:1

como eluyente, la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se diluye con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se adicionan 5 mL de una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con el mismo disolvente (3x10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera y se secan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Tras evaporar el disolvente se obtiene un aceite incoloro que se purifica por cromatografía en columna, utilizando como eluyente  $\text{CHCl}_3$ , para obtener el éster de NHS **43** (77 mg, 75%).

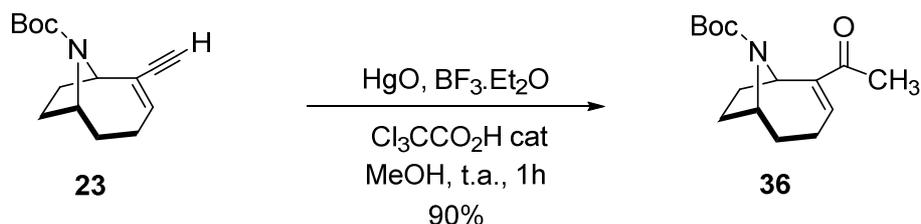
**Datos espectroscópicos de 43:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (una mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se dan sólo las señales del mayoritario),  $\delta$  6.79 (1H, m, H-3), 5.13 (1H, m, H-1), 4.44–4.25 (1H, m, H-6), 2.83 (4H, s ancho,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.65 (2H, m, H-2'), 2.42 (5H, m, H-5', H-4, H-8), 2.10 (4H, m, H-3', H'-8, H-7), 1.65 (5H, m, H-4', H-5, H'-7), 1.39 (9H, s,  $\text{CMe}_3$  Boc);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  199.6 (C=O, C-1'), 168.9 ( $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 165.5 (C=O, C-6'), 157.6 (C=O Boc), 149.9 (C-2), 141.2 (C-3), 79.6 ( $\text{CMe}_3$  Boc), 55.1 (C-6), 53.3 (C-1), 36.7 (C-2'), 33.6 (C-5'), 31.5 (C-8), 31.1 (C-7), 30.5 (C-4'), 28.9 (C-5), 28.5 ( $\text{CMe}_3$  Boc), 25.6 ( $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 24.5 (C-4), 24.3 (C-3'); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  449.2282, encontrada 449.2281.



Sal del ácido trifluoroacético de *rac*-2,5-dioxopirrolidin-1-il-6-((1*R*\*,6*R*\*)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)-6-oxohexanoato (**44**). Una disolución de 25 mg (0.055 mmol) del éster de NHS **43** en 1 mL de una mezcla 1:1 de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ - $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  durante 1 h. El disolvente y exceso de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  se evaporan y a presión reducida para proporcionar la sal con el ácido trifluoroacético del NHS-hapteno AN*m* (**44**) como un aceite incoloro (24.4 mg, 96%).

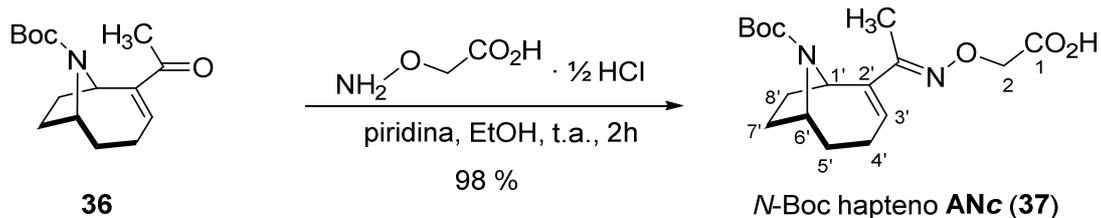
**Datos espectroscópicos de 44:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) 7.26 (1H, dd,  $J = 8.0, 3.7$  Hz, H-3'), 5.13 (1H, aparente d,  $J = 9.2$  Hz, H-1'), 4.30 (1H, m, H-6'), 2.75 (4H, s ancho,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.75–2.70 (2H, m, H-5), 2.64–2.59 (4H, m, H-2, H-4'), 2.51–2.40 (2H, m, H-8'), 2.36–2.27 (1H, m, H-7'), 2.10 (1H, m, H-5'), 1.98 (1H, m, H-7'), 1.95–1.82 (3H, m, H-4, H-5'), 1.70 (2H, m, H-3).  $^{19}\text{F-RMN}$  (282 MHz,  $\text{THF-d}_8$ )  $\delta$ -76.86.

## 5.2.1.4 Síntesis del hapteno ANc



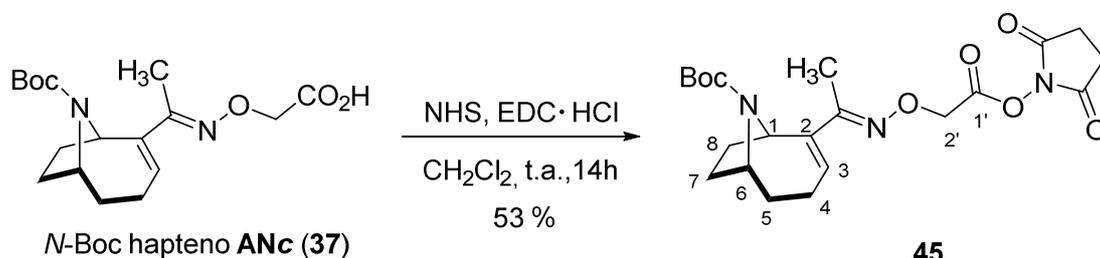
***rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de *terc*-butilo (36).** Una disolución preparada a partir de 1 mg de ácido tricloroacético, 22  $\mu\text{L}$  de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  en 1.9 mL de metanol se adiciona gota a gota sobre una mezcla preparada a partir de 140 mg (0.569 mmol) del alquino **23** (0.283 mmol) y 0.5 equivalentes de  $\text{HgO}$  (62 mg, 0.284 mmol) en 3.6 mL de  $\text{MeOH}$  anhidro bajo atmosfera inerte. La mezcla de reacción resultante se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se adicionan a la mezcla de reacción 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se continúa la agitación 15 min adicionales. Finalizado el tiempo indicado, la mezcla de reacción se vierte sobre 10 mL de agua fría y 5 mL de disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera, se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentran a presión reducida proporcionando un aceite amarillo. La purificación por cromatografía en columna, utilizando como eluyente Hexano-AcOEt 9:1, proporciona *N*-Boc anatoxina-a **36** como un aceite incoloro (134 mg, 90%), cuyas propiedades espectroscópicas coinciden con las descritas previamente en la bibliografía.<sup>85,91,197,233,234</sup>

**Datos espectroscópicos de 36:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2978.5d, 2925.8d, 2853.6d, 1690.6m, 1662.9m, 1404.7m, 1390m, 1363.2m, 1337.5m, 1231m, 1168m, 1108.1m, 991.3d;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 3:1; se describe mayoritario)  $\delta$  6.81 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, m, H-1), 4.44–4.23 (1H, m, H-6), 2.52–2.43 (2H, m, H-4), 2.29 (3H, s, Me), 2.22–2.0 (3H, m, H-8, H-7), 1.69–1.60 (3H, m, H-5, H-7), 1.37 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  197.9 ( $\text{C=O Boc}$ ), 150.5 (C=O Boc), 142.2 (C-2), 141.4 (C-3), 79.5 ( $\text{CMe}_3 \text{ Boc}$ ), 55.8 (C-6), 53.2 (C-1), 31.6 (C-8), 30.5 (C-7), 29.1 (C-5), 28.9 y 28.6 ( $\text{CMe}_3 \text{ Boc}$ ), 25.5 (Me), 24.3 (C-4); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  266.1751, encontrada 266.1747.



Ácido *rac*-2-(((*E*)-1-((1*R*\*,6*R*\*)-9-(*tert*-butoxicarbonil)-9-azabicyclo [4.2.1]non-2-en-2-ylidene)amino)oxi)acético (**37**). 46  $\mu\text{L}$  de piridina se adicionan a una disolución de 50 mg (0.178 mmol) de *N*-Boc anatoxina (**36**) y 3.0 equivalentes (0.534 mmol) del clorhidrato del ácido amino-oxiacético en 3.2 mL de etanol seco bajo atmósfera de argón. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h, al término de las cuales se confirma por CCF (usando como eluyente  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CO}_2\text{H-MeOH}$  en proporción 92:4:4) el consumo de todo el material de partida. La mezcla de reacción se vierte sobre una mezcla de 15 mL de agua-hielo y 10 mL de HCl 1 M, se extrae con  $\text{CHCl}_3$  (4x10 mL) y las fases orgánicas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La evaporación del disolvente a presión reducida proporciona un aceite ligeramente amarillo correspondiente a la oxima **37** (59 mg, 98%) que por  $^1\text{H}$  RMN muestra ser prácticamente pura y no precisa de purificación adicional.

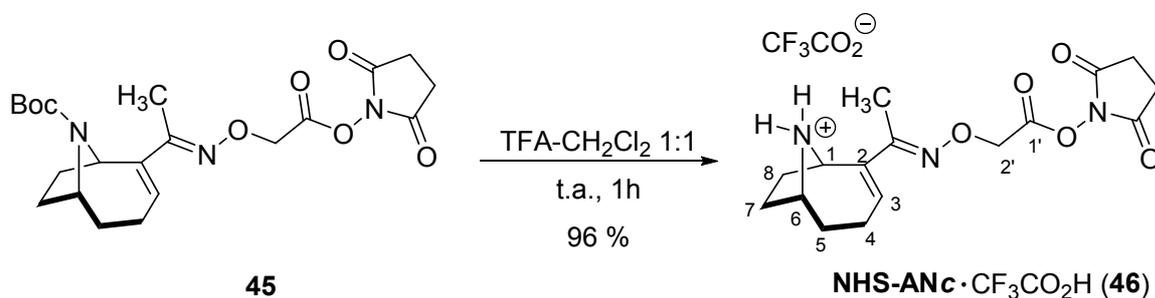
**Datos espectroscópicos 37:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2972.6d, 2929.2d, 2539.5d, 1739.9d, 1674.0f, 1593.5d, 1476.5d, 1408.4m, 1364m, 1336.8d, 1257.2 d, 1168.8m, 1,109.8m, 1066.4m;  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se dan sólo las señales del mayoritario)  $\delta$  6.07 (1H, m, H-3'), 5.15 (1H, m, H-1'), 4.66 (2H,m, H-2), 4.36 (1H, m, H-6'), 2.39–2.25 (2H, m, H-4'), 2.22-2.12 (3H, m, H-7', H-8'), 2.01 (3H, s, *Me*-C=N), 1.78–1.51 (3H, m, H-5', H-7'), 1.38 (9H, s, *CMe}\_3* Boc)  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.9 (C-1), 157.7 (C=NO), 153.7 ( $\text{CO}_2$  Boc), 144.9 (C-2'), 132.1 (C-3'), 79.1 (*CMe}\_3* Boc), 68.6 (C-2), 55.5 (C-6'), 55.2 (C-1'), 34.3 (C-8'), 31.5 (C-7'), 28.6 (*CMe}\_3* Boc), 24.2 (C-4'), 11.3 (*Me*-C=N); **EMAR** (ES) *m/z* calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$  [M+H] $^+$  339.1914, encontrada 339.1912.



*rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-((*E*)-1-((2-((1-*il*)oxi)-2-oxoetoxi)imino)etil-9-azabicyclo [4.2.1]non-2-en-9-carboxilato de *tert*-butilo (**45**). Una disolución de 86.6 mg (0.256 mmol) del ácido **37**, 1.5 equivalentes (44.2 mg, 0.384 mmol) de NHS y 1.5 equivalentes (73.6 mg, 0.384 mmol) de EDC·HCl en 6.0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco se agita a temperatura ambiente

bajo atmósfera de  $N_2$  y el avance de la reacción se controla por CCF, usando cloroformo-acetona 9:1 como eluyente. Tras 17 h de reacción se confirma la desaparición del material de partida, la mezcla de reacción se diluye con  $CH_2Cl_2$ , luego se adicionan 2 mL de una disolución saturada de  $NH_4Cl$  y se extrae con el mismo disolvente (3x10 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $Na_2SO_4$  anhidro. Tras evaporar el disolvente a vacío se obtiene un aceite incoloro que se purifica por cromatografía en columna, utilizando como eluyente  $CHCl_3$ , obteniéndose el éster de NHS **45** (59 mg, 53%).

**Datos espectroscópicos de 45:** IR (ATR)  $\nu_{max}/cm^{-1}$  2973d, 2928.6d, 1826.7d, 1787.8d, 1737.8f, 1682.6f, 1407.4m, 1363.4m, 1199.6m, 1169.3m, 1109.8m, 1071.4f, 861m, 750.7m;  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ) (una mezcla de 2 rotámeros en proporción 2:1; se describe mayoritario)  $\delta$  6.05 (1H, ddd,  $J = 6.1, 6.1, 0.5$  Hz, H-3), 5.15 (1H, m, H-1), 4.97 (2H, m, H-2'), 4.31 (1H, m, H-6), 2.84 (4H, s ancho,  $COCH_2CH_2CO$ ), 2.37-2.20 (3H, m, H<sub>2</sub>-4 y H-8), 2.20-2.03 (2H, m, H-5 y H-7), 2.00 (3H, s, Me), 1.80-1.55 (3H, m, H'-8, H'-7 y H'-5), 1.37 (9H, s,  $Me_3C$ -Boc);  $^{13}C$ -RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  168.8 ( $COCH_2CH_2CO$ ), 165.5 (C-1'), 157.7 (C=NO), 153.7 ( $CO_2$ -Boc), 144.9 (C-2), 132.1 (C-3), 79.1 ( $Me_3C$ -Boc), 68.6 (C-2'), 55.5 (C-6), 55.2 (C-1), 31.9 (C-5), 31.5 (C-8), 29.8 (C-7), 28.6 ( $Me_3C$ -Boc), 25.7 ( $COCH_2CH_2CO$ ), 24.2 (C-4), 11.3 (Me); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $C_{21}H_{30}N_3O_7$   $[M+H]^+$  436.2078 encontrada 436.2083.



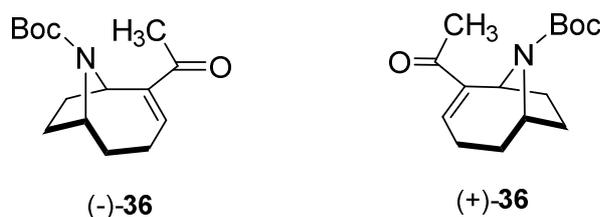
Trifluoroacetato de *rac*-(1*R*\*,6*R*\*)-2-((*E*)-1-((2,5-dioxopirrolidin-1-il) oxi)-2-oxoetoxi)imino)etil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-ilo (NHS-Hapteno ANc, **46**). Una disolución de 28.0 mg (0.064 mmol) del éster de NHS **45** en 1 mL de una mezcla 1:1 de  $CF_3CO_2H$ - $CH_2Cl_2$  se agita durante 1 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $N_2$ . La finalización de la reacción se monitoriza por CFF, empleando cloroformo-acetona 8:2 como eluyente, para comprobar la ausencia del material de partida; Finalizada la reacción, el disolvente y el exceso de  $CF_3CO_2H$  se evaporan a presión reducida, para proporcionar un aceite incoloro correspondiente a NHS-hapteno ANc como sal del ácido trifluoroacético (**46**) (27.7 mg, 96%).

**Datos espectroscópicos de 46:** IR (ATR)  $\nu_{max}/cm^{-1}$  2948.1d, 2359.6d, 1783.8d, 1737.4f, 1705.2f, 1668.8f, 1429.5d, 1191.0f, 1132.7f, 1074.1f, 720.1f;  $^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.45 (1H, ddd,  $J = 6.0, 6.0, 0.5$  Hz, H-3), 5.43 (1H, m, H-1), 4.92 (2H, aparente s ancho, H-2'), 4.37 (1H, m, H-6), 2.82 (4H, s ancho,  $COCH_2CH_2CO$ ), 2.56

(3H, m, H<sub>2</sub>-4 y H-8), 2.34 (1H, m, H-5), 2.06-1.98 (3H, m, H<sup>1</sup>-8, H<sup>2</sup>-5 y H-7), 2.01 (3H, s, Me), 1.88 (1H, m, H<sup>1</sup>-7); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.4 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 165.3 (C-1'), 156.6 (C=NO), 140.3 (C-2), 136.3 (C-3), 69.4 (C-2'), 59.6 (C-6), 54.4 (C-1), 30.1 (C-8), 28.8 (C-7), 27.9 (C-5), 25.1 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 23.3 (C-4), 10.8 (Me); <sup>19</sup>F-RMN (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -76.34 (s); EMAR (ES) *m/z* calculada para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 336.1554, encontrada 336.1565.

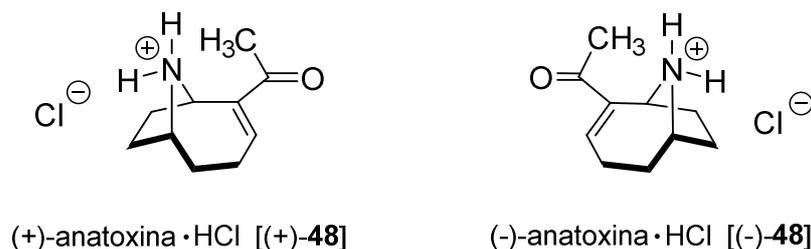
### 5.3. Obtención de los enantiómeros (+)- y (-)-anatoxina-a

#### 5.3.1 Separación de los enantiómeros de *N*-Boc anatoxina (36)



La obtención de los enantiómeros de anatoxina-a se realizó a partir de los enantiómeros de la *N*-Boc anatoxina-a (**36**), los cuales fueron previamente separados cromatográficamente a partir de la correspondiente mezcla racémica. La separación de ambos enantiómeros de **36** se llevó a cabo utilizando una columna de HPLC semipreparativa quiral de fase normal, serie AD-H (1cm Ø x 25 cm) DIACEL<sup>TM</sup> mod. 19335, utilizando un equipo de HPLC equipado con un loop de 500 µL y con el detector de UV ajustado a 230 nm. Se aplicó un flujo de 4.0 mL/min, una presión de 50 bar y una concentración de 5.6 mg/mL de *N*-Boc anatoxina-a en cada inyección; utilizando como eluyente una mezcla de hexano-isopropanol 99:1 (ver **Figura 3.17** del apartado de discusión y resultados). Se separaron un total de 42 mg de la mezcla racémica de **36**, que proporcionaron, después de reunir y concentrar a presión reducida las fracciones conteniendo cada uno de los enantiómeros, 21.0 mg del enantiómero menos polar, (+)-**36**, y 20.9 mg del enantiómero más polar, (-)-**36**. La actividad óptica de cada uno de ellos se determinó en disolución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; los valores obtenidos para cada uno de los enantiómeros de *N*-Boc-anatoxina-a se describen en la **Tabla 3.3** del apartado de resultados y discusión.

### 5.3.2 Formación de los clorhidratos de (+)- y (-)-anatoxina-a



20 mg (0.075 mmol) de cada enantiómero de **36** se tratan con 1 mL de una mezcla 1:1 de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 1 h, con agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Después de completado el tiempo de reacción la disolución resultante se decanta sobre 10 mL de una disolución fría de  $\text{NaHCO}_3$ , se mezcla y se adiciona otro volumen (10 mL) de una disolución fría 1 M de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x 15 mL). Las fases orgánicas se secan empleando primero salmuera y luego  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se filtran. A continuación, las fases orgánicas reunidas se tratan con 1.5 mL de una disolución comercial 3 M de HCl en MeOH y la disolución resultante se agita brevemente. Finalmente, tras evaporar el disolvente a presión reducida y secar a vacío durante 24 h, se obtiene el clorhidrato correspondiente a cada enantiómero de anatoxina-a (15.0 mg, 98%) como un sólido fino blanco de aspecto vidrioso que se adhiere a las paredes del recipiente.<sup>197</sup> La actividad óptica de cada uno de los clorhidratos enantioméricos, (+)-**48** y (-)-**48**, se determinó en disolución de EtOH; los valores obtenidos se describen en la **Tabla 3.3** del apartado de resultados y discusión.

## 5.4. Síntesis del hapteno de anatoxina-a derivatizada

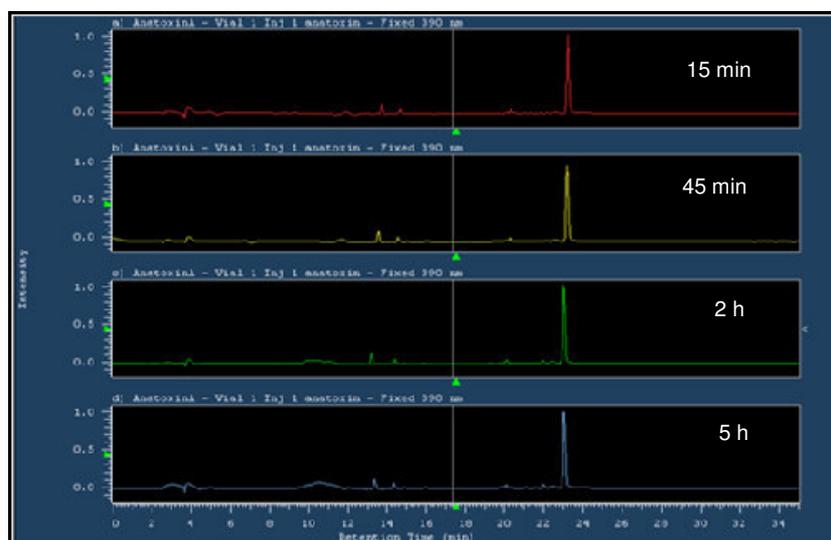
### 5.4.1. Ensayos preliminares de reactividad de anatoxina-a con el reactivo de Sanger

Los ensayos de derivatización se llevaron a cabo con anatoxina-a como sal del ácido trifluoroacético (100 ppm) en medio acuoso tamponado a pH 9.6 con borato sódico 0.1 M y 5.0 equivalentes del reactivo derivatizante 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB). La reacción se siguió por HPLC de fase reversa (columna: C18, Viny 50  $\mu\text{L}$ ; fase móvil: 80% acetonitrilo en agua; flujo: 1 mL/min); el avance de la reacción durante los primeros 15 min fue lento, apareciendo un pequeño pico a un tiempo de retención ( $T_R$ ) de 23.8 min (máximo de absorción a  $\lambda=390$  nm), asignable al producto derivatizado AN-DNB (ver **Esquema 3.2** del apartado de resultados y discusión, página **58**). No se observó avance de la reacción en estas condiciones después de 2 h de reacción (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1.** Cromatograma de HPLC en fase reversa del seguimiento de la reacción de derivatización de anatoxina-a con el reactivo FDNB en medio acuoso tamponado a pH 9.6

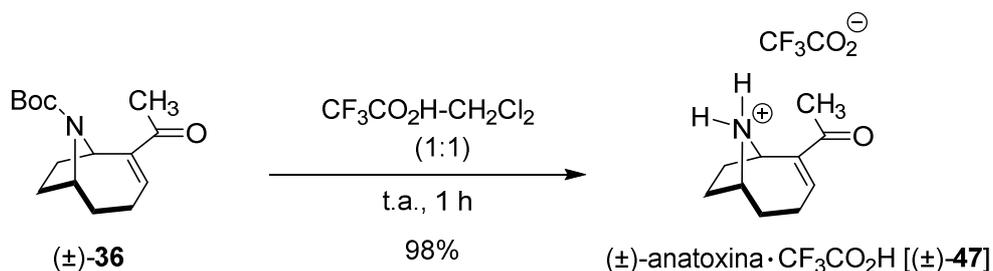
Sin embargo, cuando se preparó una nueva mezcla de reacción utilizando un 50% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  en la disolución del agente derivatizante FDNB, se observó un avance rápido de la reacción, completándose prácticamente en su totalidad tras los primeros 15 min (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Cromatograma de HPLC en fase reversa del seguimiento de reacción de derivatización de anatoxina-a con reactivo FDNB en medio 50% ACN- $\text{H}_2\text{O}$  tamponado a pH 9.6

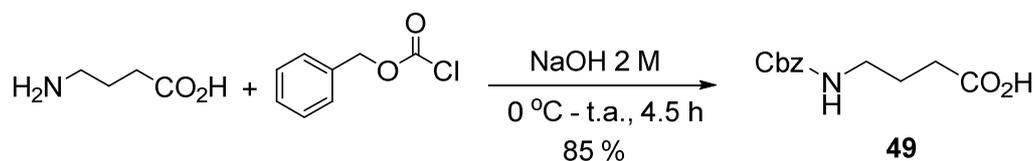
Dado que en estas condiciones no se apreciaba el pico de anatoxina-a, la mezcla de reacción se analizó por HPLC-MS para verificar la reacción de anatoxina-a y se encontró que, efectivamente, a los 15 min de reacción se había consumido prácticamente la totalidad de la misma.

## 5.4.2 Síntesis del hapteno ANd



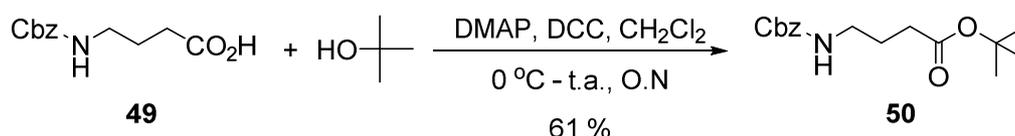
Trifluoroacetato de *rac*-(1*R*\*;6*R*\*)-2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-io (47). Una disolución de 21.0 mg (0.079 mmol) de *N*-Boc anatoxina-a (36) en 1 mL de una mezcla 1:1 de CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte de N<sub>2</sub> durante 1 h. La evaporación del disolvente a vacío proporciona anatoxina-a en forma de sal con el ácido trifluoroacético 47 (21.6 mg, 98%) como un aceite incoloro.

**Datos espectroscópicos de 47:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2950.8d, 2924.1d, 2359.6d, 2337.4d, 2079.2d, 1668.6d, 1225.1m, 1052.3f, 994.0f, 796.0m; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.14 (1H, m, H-3), 5.28–5.15 (1H, m, H-1), 4.29 (1H, m, H-6), 2.64–2.51 (2H, m, H-4), 2.51–2.33 (2H, m, H-8), 2.29 (3H, s, Me), 2.24–2.12 (1H, m, H-7), 2.0–1.78 (3H, m, H-5 y H<sup>7</sup>); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.7 (C=O), 161.1 (C=O F<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 146.1 (C-3), 144.2 (C-2), 58.7 (C-6), 52.3 (C-1), 30.5 (C-8), 27.8 (C-7), 27.5 (C-5), 25.0 (Me), 23.6 (C-4); EMAR (ES) *m/z* calculada para C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>NO [M-CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 166.1226, encontrada 166.1221.

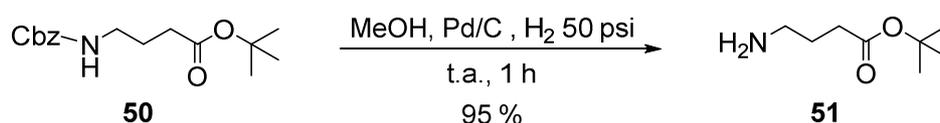


Ácido 4-(((benciloxi)carbonil)amino)butanoico (49). 2.4 mL de una disolución acuosa 2 M de NaOH fría se añaden gota a gota y con agitación sobre 500 mg (4.84 mmol) de ácido  $\gamma$ -aminobutírico comercial enfriado en un baño de hielo. A continuación, manteniendo la disolución anterior en frío, se adicionan gota a gota 1.1 equivalente (763  $\mu$ L, 5.33 mmol) de cloroformiato de bencilo. La reacción se mantiene a pH $\approx$ 10 durante los primeros 15-20 min de reacción por adición de una disolución acuosa 3 M de NaOH. Una vez el pH se mantiene estable, se retira el baño frío y se dejó avanzar la reacción a temperatura ambiente durante 4.5 h. Después de transcurrido el tiempo señalado, la mezcla de reacción se extrae con Et<sub>2</sub>O (2x10 mL) y la fase acuosa resultante se enfría en un baño de hielo y se ajusta el pH a 1–2 utilizando una disolución acuosa 6 M de HCl. La suspensión ácida resultante se satura con NaCl y se extrae con AcOEt (3x15 mL); las fases

orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La evaporación del disolvente a presión reducida proporciona un aceite ligeramente amarillo, el cual se lava repetidas veces con  $\text{Et}_2\text{O}$  dejando un sólido blanco correspondiente al ácido carboxílico *N*-Cbz protegido **49** (980 mg, 85%). Los datos físicos y espectroscópicos del producto obtenido se corresponden con los descritos previamente en la literatura (CAS No. 5105-78-2).<sup>235,236</sup>

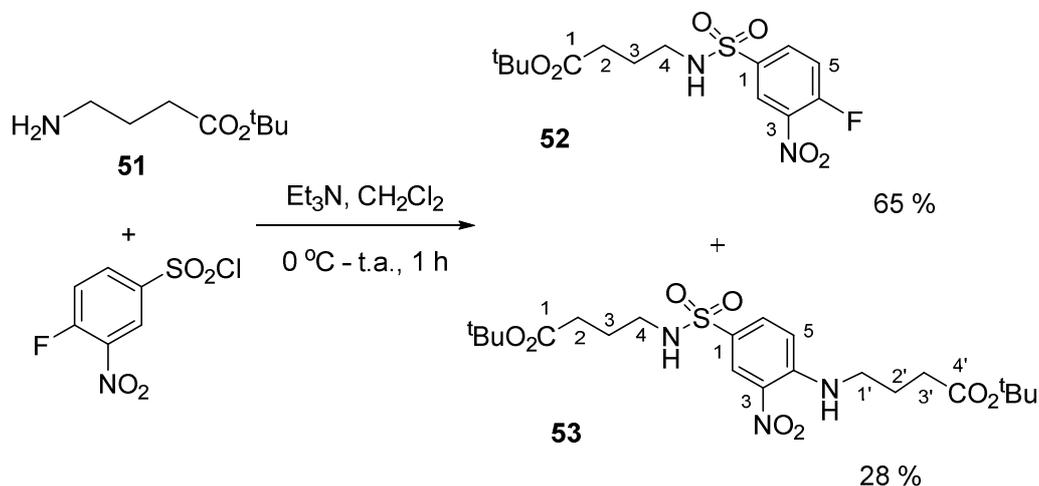


**4-(((Benciloxi)carbonil)amino)butanoato de *terc*-butilo (50).** 3.6 equivalentes (1.33 mL, 13.95 mmol) de alcohol *terc*-butílico anhidro se añaden bajo argón sobre una disolución preparada a partir de 920 mg (3.87 mmol) del aminoácido *N*-Cbz protegido **49** y 0.12 equivalentes (57 mg, 0.465 mmol) de DMAP en 5.2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. La disolución resultante se enfría en un baño de hielo y se adicionan, gota a gota con fuerte agitación, 4 mL de una disolución preparada a partir de 1.15 g (1.4 equivalentes, 5.57 mmol) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro. La mezcla de reacción se agita durante 30 min en frío para después dejarla avanzar durante toda la noche a temperatura ambiente, observándose la aparición de un precipitado blanco. El avance de la reacción se sigue por CCF, empleando hexano-AcOEt 7:3 como eluyente. Al día siguiente, la mezcla de reacción se filtra para separar el sólido, utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para lavar, y el filtrado se lava primero con 20 mL de disolución fría 1 M de HCl, luego con salmuera, disolución acuosa al 5% de  $\text{NaHCO}_3$  y nuevamente salmuera. Finalmente, la mezcla de reacción se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentra por evaporación del disolvente a vacío. El residuo aceitoso obtenido se purifica por cromatografía en columna, eluyendo con una mezcla de hexano-AcOEt (8:2), obteniendo así el éster *terc*-butílico **50** como un aceite incoloro que solidifica a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (695.0 mg, 61%). Los datos espectroscópicos del producto obtenido coinciden totalmente con los descritos previamente para el mismo compuesto (CAS No. 5105-79-3).<sup>236,237</sup>



**4-Aminobutanoato de *terc*-butilo (51).** Una mezcla de 404.5 mg (1.37 mmol) del éster *terc*-butílico **50** y 41 mg de catalizador de 10% Pd/C en 3.5 mL de metanol seco se agita bajo una presión de 50 psi de  $\text{H}_2$  a temperatura ambiente durante 1 h. Después de transcurrido el tiempo indicado, se filtra la mezcla través de celite para separar el catalizador y el filtrado se concentra a presión reducida, con

precaución de no evaporar la relativamente volátil amina libre, para obtener un aceite incoloro correspondiente a la amina **51** (208.6 mg, 95%). La amina obtenida, aparentemente no muy estable, se utiliza directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. Los datos espectroscópicos obtenidos para este producto coinciden con los ya descritos previamente (CAS No. 50479-22-6).<sup>236,237</sup>

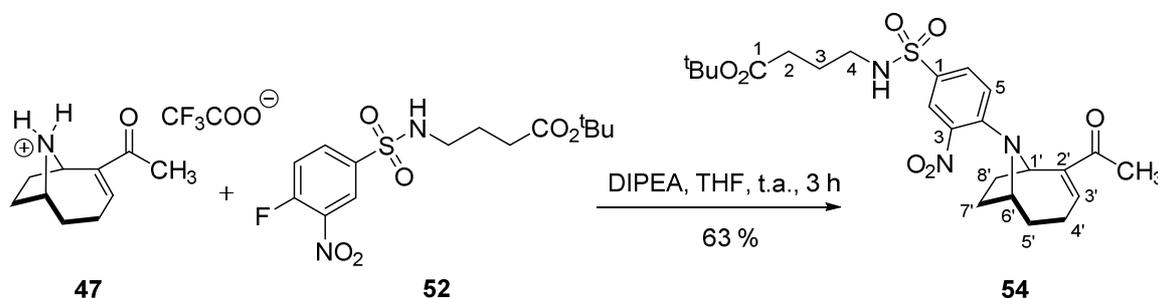


**4-((4-Fluoro-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoato de *terc*-butilo (**52**).** 1.01 equivalentes (88  $\mu\text{L}$ , 0.634 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$  se adicionan, gota a gota y bajo atmósfera de Ar, sobre una disolución de 100 mg (0.628 mmol) del amino-éster *terc*-butílico **51** y 1.01 equivalentes (152 mg, 0.634 mmol) del cloruro de 4-fluoro-3-nitrobenzenosulfonilo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a 0  $^\circ\text{C}$ . La reacción se agita durante 10-15 min en el baño de hielo y luego a temperatura ambiente, controlando su avance por CCF empleando como eluyente hexano-AcOEt 1:1. Después de aproximadamente 1 h, la mezcla de reacción se procesa diluyendo con agua y extrayendo con AcOEt (3x15 mL) para luego lavar las fases orgánicas con salmuera y secarlas sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La evaporación del disolvente a presión reducida proporciona un residuo amarillo que se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente hexano-AcOEt 8:2, para obtener, en orden de elución, el producto correspondiente a la sulfonamida **52** (148 mg, 65%) como un sólido amarillo, seguido del producto de doble reacción de sustitución **53** (64 mg, 28%) también como un sólido amarillo.

**Datos espectroscópicos de 52:** Pf 87.8-88.8  $^\circ\text{C}$  (hexano); IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3161.7d, 2348.4f, 1690.7d, 1607d, 1349d, 1335.4d, 1288.3d, 1167.4d, 1145.5d, 1070.4d, 965.4d;  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.55 (1H, dd,  $J = 6.8, 2.3$  Hz, H-2 Ph), 8.13 (1H, ddd,  $J = 8.7, 4.0, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 7.46 (1H, dd,  $J = 10.0, 8.7$  Hz, H-5 Ph), 5.44 (1H, t ancho,  $J = 6.0$  Hz, NH), 3.05 (2H, td,  $J = 6.6, 6.6$  Hz, H-4), 2.29 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-2), 1.78 (2H, quint,  $J = 6.8$  Hz, H-3), 1.42 (9H, s,  $\text{CMe}_3$ );  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.6 ( $\text{CO}_2$ ), 159.4 (C-4 Ph), 155.8 (C-3 Ph), 137.8 (C-1 Ph), 137.7 (C-6 Ph), 134.2 (C-5 Ph), 120.0 (C-2 Ph), 81.3 ( $\text{CMe}_3$ ), 42.8 (C-4), 32.7 (C-2), 28.2

( $CMe_3$ ), 24.7 (C-3);  $^{19}F$ -RMN (282 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  -110.79 (s); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $C_{14}H_{20}FN_2O_6S$   $[M+H]^+$  363.1021, encontrada 363.1020.

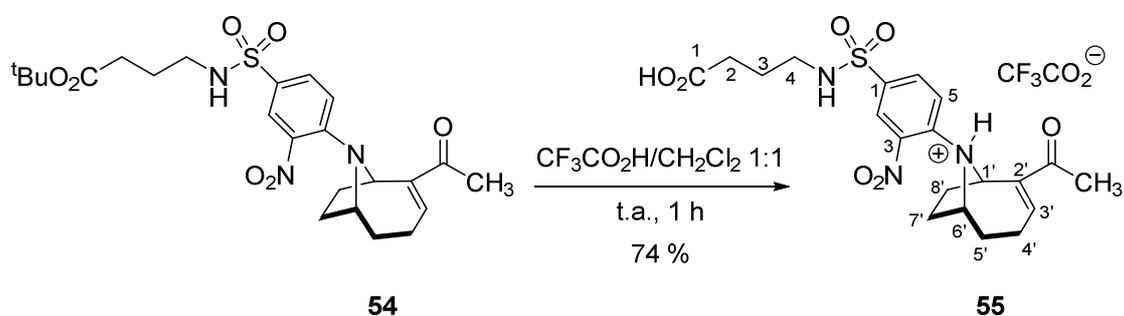
**Datos espectroscópicos de 53:** Pf 106-107.5 °C (hexano);  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.67 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-2 Ph), 8.42 (1H, t,  $J$  = 5.6 Hz, PhNH), 7.83 (1H, dd,  $J$  = 9.4, 2.6 Hz, H-6 Ph), 7.01 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz, H-5 Ph), 4.83 (1H, t,  $J$  = 6.1 Hz, N $HSO_2$ ), 3.43 (2H, m, H-1'), 3.00 (2H, td,  $J$  = 6.7, 6.7 Hz, H-4), 2.38 (2H, t,  $J$  = 7.0 Hz, H-3'), 2.28 (2H, t,  $J$  = 7.0 Hz, H-2), 2.01 (2H, dt,  $J$  = 7.0 Hz, H-2'), 1.77 (2H, dt,  $J$  = 6.8 Hz, H-3), 1.46 y 1.42 (9H cada uno, s,  $2xCMe_3$ );  $^{13}C$ -RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  172.7 y 172.1 ( $2xCO_2^tBu$ ), 147.4 (C-4 Ph), 133.9 (C-6 Ph), 131.0 (C-3 Ph), 127.5 (C-2 Ph), 126.5 (C-1 Ph), 114.7 (C-5 Ph), 81.2 y 81.0 ( $2xCMe_3$ ), 42.8 (C-1'), 42.7 (C-4), 32.7 (C-3'), 32.5 (C-2), 28.3 y 28.2 ( $2xCMe_3$ ), 24.9 (C-2'), 24.2 (C-3). EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $C_{22}H_{36}N_3O_8S$   $[M+H]^+$  502.2218, encontrada 502.2228.



***rac*-4-((4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-3-nitrofenil)sulfonamido)-butanoato de *tert*-butilo (54).** 1.1 equivalentes (47  $\mu$ L, 0.268 mmol) de diisopropiletilamina (DIPEA) se adicionan gota a gota bajo  $N_2$  sobre una disolución de 1.0 equivalente (65 mg, 0.243 mmol) de la sal de anatoxina con el ácido trifluoroacético **47** en 1.5 mL de THF a 0 °C. La mezcla se agita a esta temperatura por 5 min y se añade lentamente con agitación una disolución preparada a partir de 1.4 equivalentes (109 mg, 0.340 mmol) del éster *tert*-butílico **52** en 1.5 mL de THF. La reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente (20-25 °C) y su evolución se controla por CCF empleando hexano-AcOEt 1:1 como eluyente. Después de 3 h, la reacción se da por finalizada, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se trata con  $CH_2Cl_2$  y agua. La mezcla se extrae con el mismo disolvente (3x15 mL) y las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $Na_2SO_4$ . Tras la evaporación del disolvente a presión reducida se obtiene un residuo aceitoso amarillo intenso que se purifica por cromatografía en columna, eluyendo con hexano-AcOEt (8:2), para obtener, en orden de elución, el éster *tert*-butílico de partida sin reaccionar **52** (29.4 mg, 26%), seguido de la anatoxina-*a* *N*-derivatizada **54** como un aceite amarillo (71.3 mg, 63%).

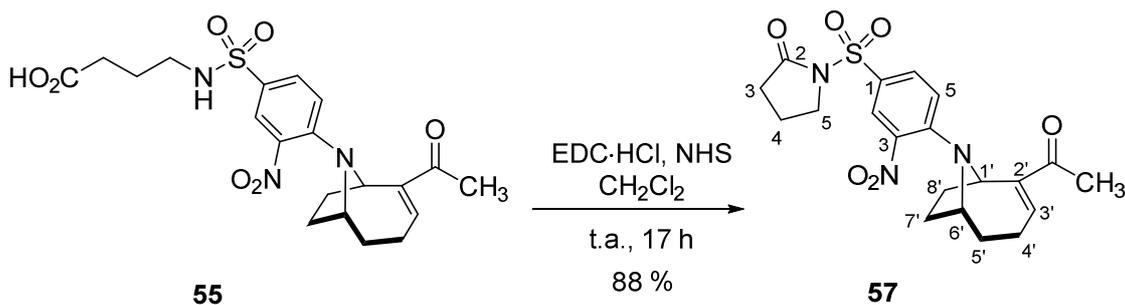
**Datos espectroscópicos de 54:** IR (ATR)  $\nu_{m\acute{a}x}/cm^{-1}$  3279.3d, 2950.8d, 2919.7d, 1732.2m, 1659.5d, 1602.9m, 1539.3m, 1493d, 1436.8m, 1348f, 1265.7m, 1238m,

1166f, 1072.9m, 902.9d, 839.3d;  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.02 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-2 Ph), 7.63 (1H, dd,  $J = 9.1, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 6.91 (1H, aparente t,  $J = 5.6$  Hz, H-3'), 6.75 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-5 Ph), 5.24 (1H, m, H-1'), 4.89 (1H, t,  $J = 6.1$ , NH), 4.24 (1H, m, H-6'), 2.98 (2H, td,  $J = 6.6, 6.6$  Hz, H-4), 2.49–2.34 (2H, m, H-4'), 2.35 (3H, s, Me), 2.32 y 1.81 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2.26 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-2), 2.26 y 1.78 (2H, m, H-7' y H'-7'), 1.86–1.73 (2H, m, H-5'), 1.78 (2H, m, H-3), 1.41 (9H, s,  $\text{CO}_2\text{Me}_3$ );  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.5 ( $\text{COMe}$ ), 173.7 ( $\text{CO}_2^t\text{Bu}$ ), 145.5 (C-2'), 144.5 (C-3'), 141.8 (C-4 Ph), 137.3 (C-3 Ph), 131.1 (C-6 Ph), 126.9 (C-1 Ph), 126.4 (C-2 Ph), 119.1 (C-5 Ph), 81.0 ( $\text{CMe}_3$ ), 58.3 (C-6'), 57.3 (C-1'), 42.7 (C-4), 31.3 (C-8'), 31.1 (C-2), 30.9 (C-7'), 28.2 ( $\text{CO}_2\text{CMe}_3$ ), 28.8 (C-5'), 25.7 (Me), 24.8 (C-3), 24.5 (C-4'); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  508.2112, encontrada 508.2089.



Trifluoroacetato del ácido *rac*-4-((4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1] non-2-en-9-il)-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoico (Hapteno AN $\alpha$ -TFA, **55**). Una disolución de 26 mg (0.055 mmol) de anatoxina *N*-derivatizada **54** en 1 mL de una mezcla 1:1 de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se agita a temperatura ambiente bajo  $\text{N}_2$  durante 1 h. Finalizada la reacción, el disolvente y exceso de  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  se evaporan a presión reducida, obteniéndose directamente el derivado carboxílico **55** en forma de sal del ácido trifluoroacético, como un aceite de color ocre (23.4 mg, 74%).

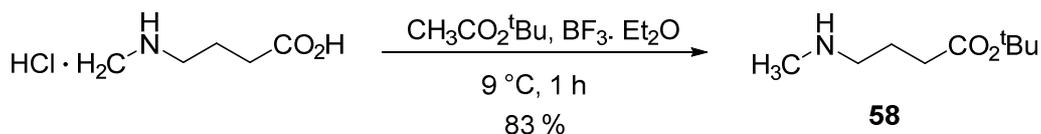
**Datos espectroscópicos de 55:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.02 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-2 Ph), 7.64 (1H, dd,  $J = 9.1, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 6.93 (1H, aparente t,  $J = 5.6$  Hz, H-3'), 6.77 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-5 Ph), 5.22 (1H, m, H-1'), 4.25 (1H, m, H-6'), 3.01 (2H, aparente t,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 2.49–2.34 (2H, m, H-4'), 2.41 (2H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-2), 2.36 (3H, s, Me), 2.32 y 1.90 (2H, m, H-8'), 2.26 y 1.72 (2H, m, H-7'), 1.84–1.79 (2H, m, H-5'), 1.82 (2H, m, H-3);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  199.0 ( $\text{COMe}$ ), 178.1 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ), 145.4 (C-2'), 144.7 (C-3'), 141.9 (C-4 Ph), 137.2 (C-1 Ph), 131.1 (C-6 Ph), 126.7 (C-3 Ph), 126.4 (C-2 Ph), 119.1 (C-5 Ph), 58.4 (C-6'), 57.3 (C-1'), 42.5 (C-4), 31.3 (C-8'), 30.9 (C-2), 30.9 (C-7'), 28.9 (C-5'), 25.7 (Me), 24.6 (C-3), 24.5 (C-4');  $^{19}\text{F-RMN}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -76.8; **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$   $[\text{M}]^+$  565.1342 encontrada 565.1346.



*rac*-1-((4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-3-nitrofenil)sulfonil)pirrolidin-2-ona (**57**). Una disolución de 12 mg (0.021 mmol) del ácido **55**, 1.5 equivalentes (4.9 mg, 0.042 mmol) de NHS y 1.5 equivalentes (8.16 mg, 0.042 mmol) de EDC·HCl en 816  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco se agita a temperatura ambiente bajo  $\text{N}_2$ , controlando su evolución por CCF, utilizando cloroformo-acetona 9:1 como eluyente. Después de 17 h se confirma la total desaparición del material de partida **55** y la mezcla de reacción se diluye con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se trata con 2 mL de una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrae con el mismo disolvente (3x10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera y se secan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro; tras evaporar el disolvente a vacío se obtiene un aceite incoloro que se purifica por cromatografía en columna, utilizando  $\text{CHCl}_3$  como eluyente, para obtener la *N*-acilsulfonamida **57** (8.1 mg, 88%).

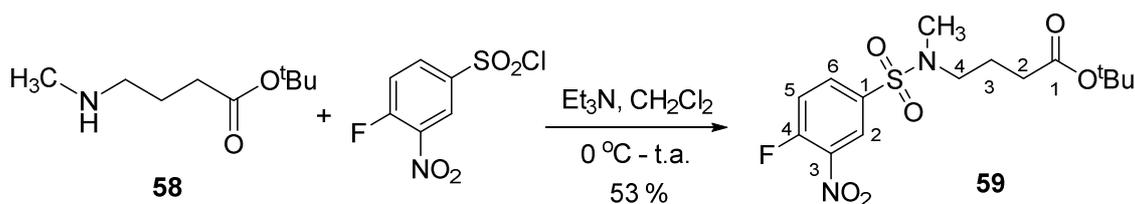
**Datos espectroscópicos de 57:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2926.9d, 2356.8f, 1733.7m, 1659.8m, 1597m, 1544.1d, 1519.4m, 1493.7m, 1418.2d, 1352f, 1280d, 1165.5f, 1116.3m, 1017.8d, 956.9m;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.16 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-2 Ph), 7.88 (1H, dd,  $J = 9.1, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 6.91 (1H, aparente t,  $J = 5.6$  Hz, H-3'), 6.76 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-5 Ph), 5.25 (1H, m, H-1'), 4.27 (1H, m, H-6'), 3.89 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-5), 2.45 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-3), 2.43–2.27 (2H, m, H-4'), 2.36 (3H, s, Me), 2.31–1.86 (2H, m, H-8'), 2.29–1.77 (2H, m, H-7'), 2.09 (2H, quint,  $J = 7.0$  Hz, H-4), 1.82–1.76 (2H, m, H-5');  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.2 (C=O), 173.6 (C-2, NCO), 145.4 (C-2'), 144.2 (C-3'), 142.6 (C-4 Ph), 137.0 (C-1 Ph), 132.4 (C-6 Ph), 127.6 (C-2Ph), 124.5 (C-3 Ph), 118.4 (C-5 Ph), 58.4 (C-6'), 57.5 (C-1'), 47.4 (C-5), 32.3 (C-3), 31.3 (C-8'), 31.0 (C-7'), 28.9 (C-5'), 25.7 (Me), 24.5, (C-4'), 18.4 (C-4); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  434.1308, encontrada 434.1377.

#### 5.4.3 Síntesis del hapteno ANdm



4-(Metilamino)butanoato de *terc*-butilo (**58**). 20 equivalentes (17.5 mL, 130.12 mmol) de acetato de *terc*-butilo se añaden sobre 1 g (6.51 mmol) del clorhidrato

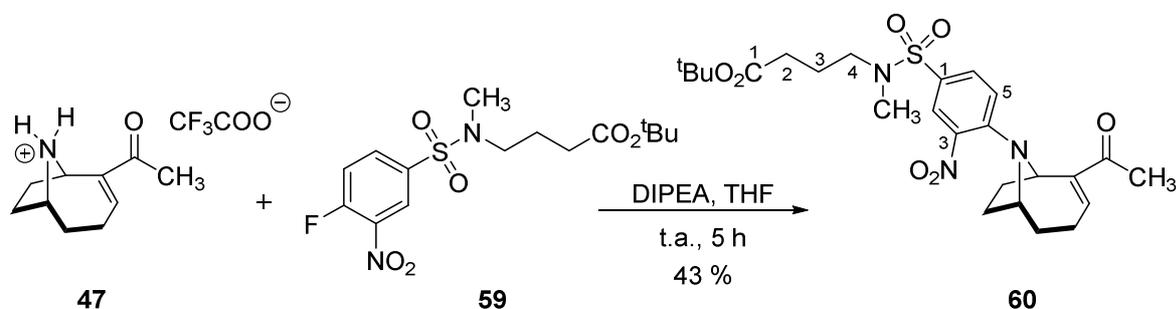
del ácido 4-(metilamino)butírico comercial bajo  $N_2$ . La suspensión obtenida se enfría en un baño hielo-agua, controlando que la temperatura interna se mantenga cerca de  $9\text{ }^\circ\text{C}$ . A continuación, se adicionan gota a gota con agitación 6.0 equivalentes (4.82 mL, 39.06 mmol) de  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ , tras lo cual se obtiene una disolución transparente. Después de 1 h de agitación conservando la temperatura mencionada ( $9\text{ }^\circ\text{C}$ ), la mezcla de reacción se diluye por adición de 20 mL de agua, se separa la fase acuosa y la fase orgánica se extrae de nuevo dos veces más con 15 mL de agua cada una. Las fases acuosas reunidas se enfrían en un baño de hielo y se basifican cuidadosamente por adición de 10 mL de una disolución acuosa 5 M de NaOH. Tras extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x20 mL), la fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida, con cuidado de no forzar el vacío dada la volatilidad del producto resultante, para obtener el éster *tert*-butílico de la *N*-metilamina **58** (940.5 mg, 83%) como un aceite ligeramente amarillo, que cristaliza a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  y cuyos datos espectroscópicos coinciden con los descritos previamente en la bibliografía (CAS No. 1246527-48-9).<sup>237</sup>



**4-((4-Fluoro-*N*-metil-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoato de *tert*-butilo (59).** Se añade  $\text{Et}_3\text{N}$  (69  $\mu\text{L}$ , 0.495 mmol, 1.2 equivalentes) gota a gota sobre una disolución de 71.6 mg (0.413 mmol) de la amina **58** y 1.01 equivalentes (100 mg, 0.417 mmol) del cloruro de 4-fluoro-3-nitrobenzenosulfonilo en 1.3 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  bajo argón. Tras 10-15 min de agitación a la misma temperatura, se retira el baño frío y se deja alcanzar temperatura ambiente, monitorizando el avance de la reacción por CCF empleando hexano-AcOEt 1:1 como eluyente. Tras aproximadamente 1 h de reacción a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluye con agua y se extrae con AcOEt (3x15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La evaporación del disolvente a presión reducida proporciona un residuo amarillo que se purifica por cromatografía en columna, empleando hexano-AcOEt 8:2 como eluyente, para obtener la sulfonamida **59** (83 mg, 53%) como un sólido amarillo.

**Datos espectroscópicos de 59:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2983.1d, 2348f, 1724.2m, 1602d, 1532m, 1457.8d, 1417d, 1395d, 1367.8m, 1341.9m, 1293d, 1270.5d, 1208m, 1147m, 1077.3d, 955.5m, 934.9m;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.45 (1H, dd,  $J = 6.8, 2.3$  Hz, H-2 Ph), 8.04 (1H, ddd,  $J = 8.7, 4.0, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 7.47 (1H, dd,  $J = 10.0, 8.7$  Hz, H-5 Ph), 3.10 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-4), 2.79 (3H, s, Me), 2.31 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-2),

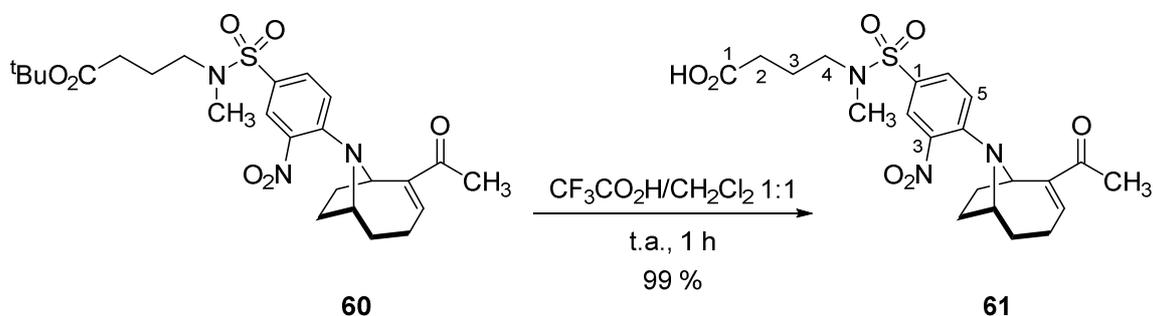
1.83 (2H, dt,  $J = 7.1$  Hz, H-3), 1.44 (9H, s,  $CMe_3$ );  $^{13}C$ -RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  172.2 ( $CO_2^tBu$ ), 159.4 (C-4 Ph), 155.8 (C-3 Ph), 135.6 (C-1 Ph), 134.1 (C-6 Ph), 125.6 (C-2 Ph), 119.7 (C-5 Ph), 80.8 ( $CMe_3$ ), 49.6 (C-4), 34.8 (Me), 32.0 (C-2), 28.2 ( $CMe_3$ ), 22.9 (C-3);  $^{19}F$ -RMN (282 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  -110.78 (s); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $C_{15}H_{22}FN_2O_6S$   $[M+H]^+$  377.1177, encontrada 377.1177.



***rac*-4-((4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-*N*-metil-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoato de *terc*-butilo (60).** 14  $\mu$ L de diisopropiletilamina (0.080 mmol, 1.1 equivalentes) se añaden gota a gota bajo  $N_2$  sobre una disolución de 1.0 equivalente (15.3 mg, 0.072 mmol) del trifluoroacetato de anatoxina-a **47** en 500  $\mu$ L de THF a 0 °C. El baño frío se retira y la mezcla se deja agitando durante 5 min, añadiendo a continuación gota a gota una disolución de 1.4 equivalentes (38.16 mg, 0.101 mmol) del fluoronitro-derivado **59** en 500  $\mu$ L de THF. Después de agitar a temperatura ambiente toda la noche se comprueba que la reacción ha finalizado (CCF con hexano-AcOEt 1:1 como eluyente), se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se trata con agua y se extrae con  $CH_2Cl_2$  (4x15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera, se secan sobre  $Na_2SO_4$  anhidro y se concentran a sequedad para proporcionar un residuo aceitoso amarillo intenso que se purifica por cromatografía en columna, eluyendo con mezcla de hexano-AcOEt 8:2, para dar, en orden de elución, el éster *terc*-butílico **59** de partida sin reaccionar (21.4 mg, 56%), seguido del derivado de anatoxina-a **60** (16.4 mg, 43%) como un aceite amarillo.

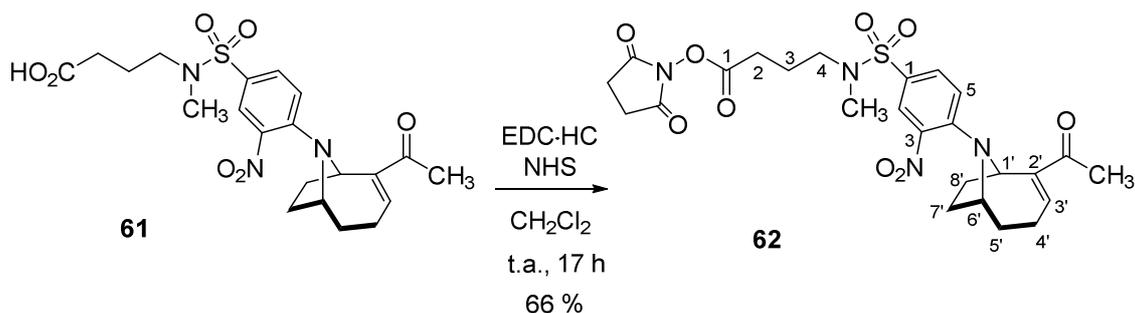
**Datos espectroscópicos de 60:** IR (ATR)  $\nu_{max}/cm^{-1}$  2973d, 2931.4d, 2359d, 2337.4d, 1723.1m, 1661.3m, 1598.7m, 1519.5m, 1491.5m, 1365.9d, 1338m, 1225m, 1228.1m, 1154.9f, 947.4d, 750.2m;  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.94 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-2 Ph), 7.57 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 6.94-6.88 (1H, m, H-3'), 6.75 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-5 Ph), 5.24 (1H, aparente d,  $J = 7.3$  Hz, H-1'), 4.24 (1H, m, H-6'), 3.02 (2H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-4), 2.72 (3H, s,  $NMe$ ), 2.43-2.27 (2H, m, H-4'), 2.36 (3H, s,  $COMe$ ), 2.33-2.28 (2H, m, H-2), 2.31 y 1.86 (2H, m, H-8'), 2.29 y 1.77 (2H, m, H-7'), 1.86-1.76 (2H, m, H-3), 1.82-1.76 (2H, m, H-5'), 1.44 (9H, s,  $CMe_3$ );  $^{13}C$ -RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  198.4 ( $COMe$ ), 172.5 ( $CO_2^tBu$ ), 145.6 (C-2'), 144.3 (C-3'), 141.6 (C-4 Ph), 137.4 (C-3 Ph), 131.3 (C-6 Ph), 126.5 (C-2 Ph), 125.0 (C-1 Ph), 119.1 (C-5 Ph), 80.7

(CO<sub>2</sub>Me<sub>3</sub>) 58.3 (C-6'), 57.2 (C-1'), 49.6 (C-4), 34.9 (NMe), 32.3 (C-2), 31.3 (C-8'), 30.9 (C-7'), 28.8 (C-5'), 28.2 (CO<sub>2</sub>Me<sub>3</sub>), 25.8 (COMe), 24.6 (C-4'), 23.0 (C-3); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup>522.2268, encontrada 522.2275.



Trifluoroacetato del ácido *rac*-4-((4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1] non-2-en-9-il)-*N*-metil-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoico (hapteno AN*dm*, **61**). Una disolución de 16.4 mg (0.031 mmol) del derivado de anatoxina-a **60** en 1 mL de una mezcla 1:1 de CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se agita a temperatura ambiente bajo N<sub>2</sub> durante 1 h. El disolvente y exceso de CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H se eliminan a presión reducida, obteniéndose el ácido carboxílico **61** en forma de sal del ácido trifluoroacético como un aceite color ocre (18.1 mg, 99%).

**Datos espectroscópicos de 61:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  2929.4d, 1708.7m, 1661.1m, 1599.7f, 1544.2d, 1521.4m, 1519.6m, 1493.8d, 1414d, 1377d, 1338.4f, 1258d, 1231d, 1160.5f, 948.5d, 750.2d; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.94 (1H, d,  $J$  = 2.3 Hz, H-2 Ph), 7.58 (1H, dd,  $J$  = 9.1, 2.3 Hz, H-6 Ph), 6.96-6.90 (1H, m, H-3'), 6.77 (1H, d,  $J$  = 9.2 Hz, H-5 Ph), 5.24 (1H, aparente d,  $J$  = 7.9 Hz, H-1'), 4.25 (1H, m, H-6'), 3.07 (2H, t,  $J$  = 6.8 Hz, H-4), 2.73 (3H, s, NMe), 2.47 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-2), 2.43-2.27 (2H, m, H-4'), 2.37 (3H, s, MeCO), 2.31 y 1.86 (2H, m, H-8'), 1.92-1.76 (2H, m, H-3), 1.85-1.72 (4H, m, H-5', H-7'); <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  198.4 (COMe), 182.5 (CO<sub>2</sub>H), 145.6 (C-2'), 144.3 (C-3'), 141.6 (C-4 Ph), 137.4 (C-3 Ph), 131.3 (C-6 Ph), 126.5 (C-2 Ph), 125.0 (C-1 Ph), 119.1 (C-5 Ph), 58.3 (C-1'), 57.3 (C-6'), 49.4 (C-4), 34.9 (NMe), 31.3 (C-2), 30.9 (C-8'), 30.6 (C-7'), 28.8 (C-5'), 25.7 (COMe), 24.6 (C-4'), 22.6 (C-3); <sup>19</sup>F-RMN (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -76.35 (s); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 466.1642, encontrada 466.1640.

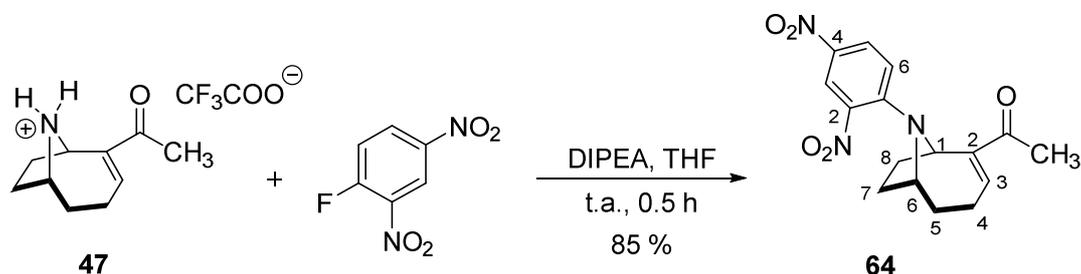


*rac*-4-((4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-*N*-metil-3-nitrofenil)sulfonamido)butanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (NHS-hapteno AN*dm*, **62**). Una disolución de 26.6 mg (0.046 mmol) del ácido carboxílico **61**, 1.5 equivalentes (7.9 mg, 0.069 mmol) de NHS y 1.5 equivalentes (13.2 mg, 0.069 mmol) de EDC-HCl en 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco se agita a temperatura ambiente bajo N<sub>2</sub> durante la noche. Una vez comprobado la finalización de la reacción por CCF, usando cloroformo-acetona 9:1 como eluyente, la mezcla de reacción se diluye con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 2 mL de una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl. La fase orgánica se separa y la acuosa se extrae con el mismo disolvente (3x15 mL). Las fases orgánicas se lavan con salmuera, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente a vacío para obtener un residuo amarillo que se purifica por cromatografía en columna, utilizando como eluyente CHCl<sub>3</sub>, para obtener el éster NHS del hapteno AN*dm* (**62**) (17.0 mg, 66%).

**Datos espectroscópicos de 62:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2 Ph), 7.59 (1H, dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, H-6 Ph), 6.92 (1H, aparente t, *J* = 5.6 Hz, H-3'), 6.77 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, H-5 Ph), 5.25 (1H, aparente d, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 4.26 (1H, m, H-6'), 3.11 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-4), 2.84 (4H, s ancho, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.76 (3H, s, *NMe*), 2.73 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H-2), 2.43–2.27 (2H, m, H-4'), 2.37 (3H, s, *COMe*), 2.31 y 1.86 (2H, m, H-8' y H'-8'), 2.32 y 1.76 (2H, m, H-7' y H'-7'), 2.01 (2H, dt, *J* = 7.2 Hz, H-3), 1.85–1.72 (2H, m, H-5'). <sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 198.4 (*COMe*), 182.5 (CO<sub>2</sub>H), 169.5 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 145.6 (C-2'), 144.3 (C-3'), 141.6 (C-4 Ph), 137.4 (C-3 Ph), 131.3 (C-6 Ph), 126.5 (C-2 Ph), 125.0 (C-1 Ph), 119.1 (C-5 Ph), 58.3 (C-1'), 57.3 (C-6'), 49.4 (C-4), 34.9 (*NMe*), 31.3 (C-2), 30.9 (C-8'), 30.6 (C-7'), 28.8 (C-5'), 25.7 (*COMe*), 25.6 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 24.6 (C-4'), 22.6 (C-3); EMAR (ES) *m/z* calculada para C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 563.1806, encontrada 563.1804.

## 5.5 Síntesis de los derivados de anatoxina-a patrones

### 5.5.1 Síntesis de anatoxina-a derivatizada con reactivo de Sanger (1-flúor-2,4-dinitrobenceno) (AN-DNB)

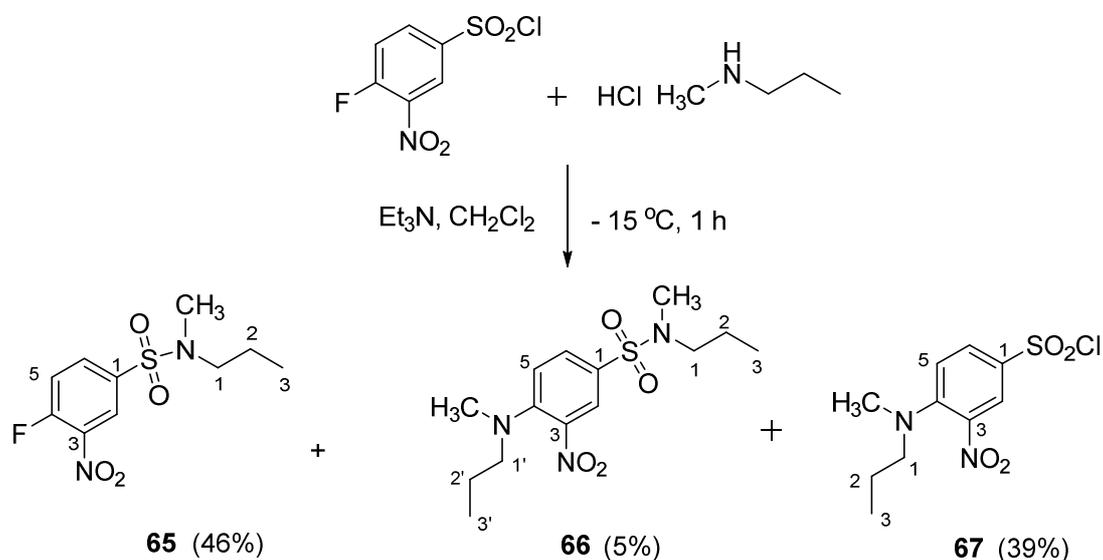


*rac*-1-((1*R*\*,6*R*\*)-9-(2,4-dinitrofenil)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il) etan-1-ona (**64**). Diisopropilamina (12.7  $\mu\text{L}$ , 0.073 mmol, 1.1 equivalente) se adiciona gota a gota sobre una disolución agitada del trifluoroacetato de anatoxina-a **47** (18.6 mg, 0.066 mmol) en 1 mL de THF seco a 0 °C bajo  $\text{N}_2$ . Después de 5 min, se retira el baño frío y se adicionan 1.4 equivalentes (17.2 mg, 0.092 mmol) de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB), manteniendo posteriormente la agitación a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se diluye en 10 mL de agua y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x10 mL), las fases orgánicas se lavan con salmuera, se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida para dar un aceite de color amarillo que se purifica por cromatografía en columna, utilizando hexano-AcOEt 8:2 como eluyente, proporcionando el *N*-dinitroaril derivado de anatoxina-a **64** (18.1 mg, 85%) como un aceite amarillo.

**Datos espectroscópicos de 64:** IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  292.3d, 1652m, 1600f, 1577.4m, 1526.3m, 1496.3f, 1316f, 1285m, 1266m, 1255.3m, 1227.6m, 1144.9m, 950.8m, 909.6m, 829m, 742f;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.47 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-3 Ph), 8.08 (1H, dd,  $J = 9.5, 2.7$  Hz, H-5 Ph), 6.93 (1H, m, H-3), 6.75 (1H, d,  $J = 9.6$  Hz, H-6), 5.32 (1H, aparente d,  $J = 6.4$  Hz, H-1), 4.30 (1H, m, H-6), 2.43–2.27 (2H, m, H-4), 2.37 (3H, s, Me), 2.31 y 1.86 (2H, m, H-8 y H<sup>1</sup>-8), 2.32 y 1.76 (2H, m, H-7 y H<sup>2</sup>-7), 1.85–1.72 (2H, m, H-5);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.1 (C=O), 145.4 (C-2), 144.3 (C-3), 136.5 (C-2 Ph), 136.5 (C-4 Ph), 127.9 (C-6 Ph), 123.5 (C-5), 118.1 (C-3 Ph), 58.5 (C-6), 57.9 (C-1), 31.2 (C-8), 30.9 (C-7), 28.8 (C-5), 25.7 (Me), 24.5 (C-4); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  332.1241, encontrada 332.1241.

## 5.5.2 Obtención de los enantiómeros del derivado de anatoxina-a AN-DM

### 5.5.2.1 Síntesis de AN-DM racémico



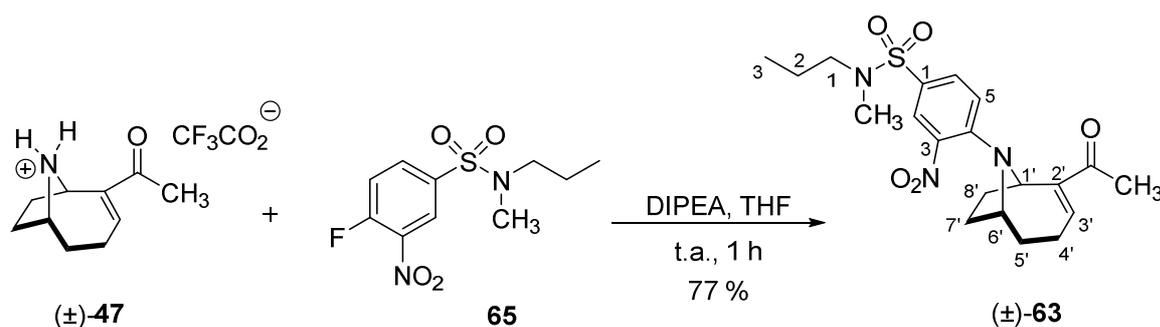
**4-Fluoro-*N*-metil-3-nitro-*N*-propilbencenosulfonamida (65).** Una disolución de 1.01 equivalentes (39.7 mg, 0.165 mmol) del cloruro de 4-flúor-3-nitrobencenosulfonamida en 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se adiciona gota a gota bajo  $\text{N}_2$  sobre una disolución de 1 equivalente (18.0 mg, 0.164 mmol) del clorhidrato de la *N,N*-metilpropilamina en 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$ . Una vez homogenizada la mezcla, se añaden a la misma temperatura 1.005 equivalentes (23  $\mu\text{L}$ , 0.165 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$ . Después de agitar durante 1 h manteniendo la temperatura antes indicada, la mezcla de reacción se trata con 10 mL de agua y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL); las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La evaporación del disolvente a vacío proporciona un residuo oleoso (49.4 mg) que se cromatografía sobre gel de sílice, utilizando hexano-AcOEt (7:3) como eluyente, para separar el material de partida, el cloruro de arilsulfonilo, sin reaccionar (4.5 mg, 10%) del resto de productos formados. Las fracciones conteniendo estos últimos (46 mg) se concentran a sequedad y el residuo se purifica por HPLC semi-preparativa en porciones de aproximadamente 6.5 mg por inyección, utilizando una columna Kromasil de fase normal (ver apartado 5.1.1) y hexano-AcOEt 95:5 como eluyente con un flujo de 10 mL/min. En estas condiciones se separan, en orden de elución, los productos **66** ( $t_{\text{R}} = 23$  min, 2.3 mg, 5%), **67** ( $t_{\text{R}} = 25$  min, 17.8 mg, 39%) y el reactivo derivatizante **65** ( $t_{\text{R}} = 32$  min, 21 mg, 46%) como un aceite amarillo.

**Datos espectroscópicos de 65:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.47 (1H, dd,  $J = 6.8, 2.3$  Hz, H-2 Ph), 8.05 (1H, ddd,  $J = 8.7, 4.0, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 7.47 (1H, dd,  $J = 10.0, 8.7$  Hz, H-5 Ph), 3.09 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-1), 2.80 (3H, s, *NMe*), 1.58 (2H, m, H-2), 0.94 (3H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.4 (C-4 Ph), 155.8 (C-3

Ph), 135.8 (C-1 Ph), 134.2 (C-6 Ph), 125.7 (C-2 Ph), 119.7 (C-5 Ph), 52.0 (C-1), 34.7 (NMe), 21.1 (C-2), 11.1 (C-3);  $^{19}\text{F}$ -RMN (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -110.78 (s); EMAR (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}_4\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  277.0653, encontrada 277.0662.

**Datos espectroscópicos de 66:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.39 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-2 Ph), 7.88 (1H, dd,  $J = 9.3, 2.5$  Hz, H-6), 7.10 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-5), 3.36 (4H, m, H-1 y H-1'), 2.93 (6H, s, 2xNMe), 1.80-1.67 (4H, m, H-2 y H-2'), 1.0-0.91 (4H, m, H-3 y H-3');  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  134.2 (C-4 Ph), 131.7 (C-6 Ph), 130.6 (C-3 Ph), 125.7 (C-2 Ph), 118.0 (C-5 Ph), 56.1 (C-2'), 52.3 (C-2), 40.9 y 34.9 (2xNMe), 21.3 (C-2), 20.6 (C-2'), 11.4 (C-3'), 11.3 (C-3).

**Datos espectroscópicos de 67:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.37 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-2 Ph), 7.83 (1H, dd,  $J = 9.3, 2.4$  Hz, H-6 Ph), 7.12 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-5 Ph), 3.36 (2H, m, H-1), 2.93 (3H, s, NMe), 1.80-1.67 (2H, m, H-2), 1.0-0.91 (2H, m, H-3);  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149.3 (C-4 Ph), 136.8 (C-3 Ph), 134.3 (C-1 Ph), 131.7 (C-6 Ph), 129.5 (C-2 Ph), 118.2 (C-5 Ph), 56.0 (C-1), 40.9 (NMe), 20.0 (C-2), 11.5 (C-3).

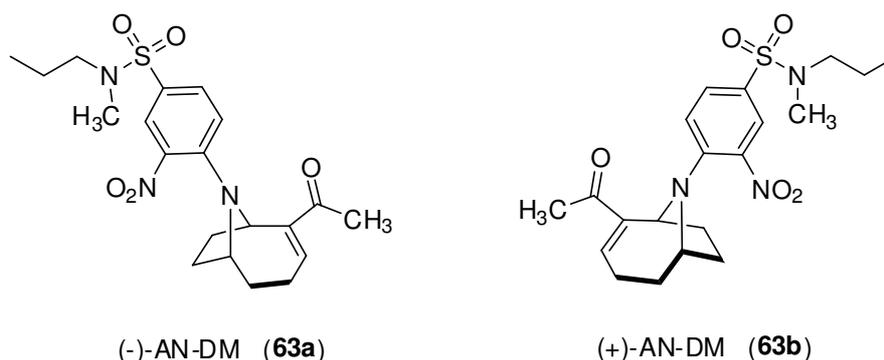


**rac-4-((1*R*\*,6*R*\*)-2-Acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-9-il)-*N*-metil-3-nitro-*N*-propilbencenosulfonamida (AN-DM, 63).** Una disolución de 12.5 mg (0.044 mmol) de la sal de anatoxina-a **47** en 400  $\mu\text{L}$  de THF anhidro es tratada de forma sucesiva, a 0  $^\circ\text{C}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$ , con una disolución preparada a partir de 1.1 equivalentes (13.6 mg, 0.049 mmol) del reactivo derivatizante **65** en 400  $\mu\text{L}$  de THF y 1.1 equivalentes (8.5  $\mu\text{L}$ , 0.048 mmol) de DIPEA. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h (monitorizando su avance por CCF eluyendo con hexano-AcOEt 1:1). La mezcla de reacción se diluye con 10 mL de agua y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x15 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavan con salmuera, se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentran a sequedad a vacío, proporcionando un residuo aceitoso de color amarillo que se purifica por cromatografía en columna, eluyendo con hexano-AcOEt 7:3, para obtener el derivado de anatoxina-a racémico **63** (14.5 mg, 77%) como un aceite amarillo.

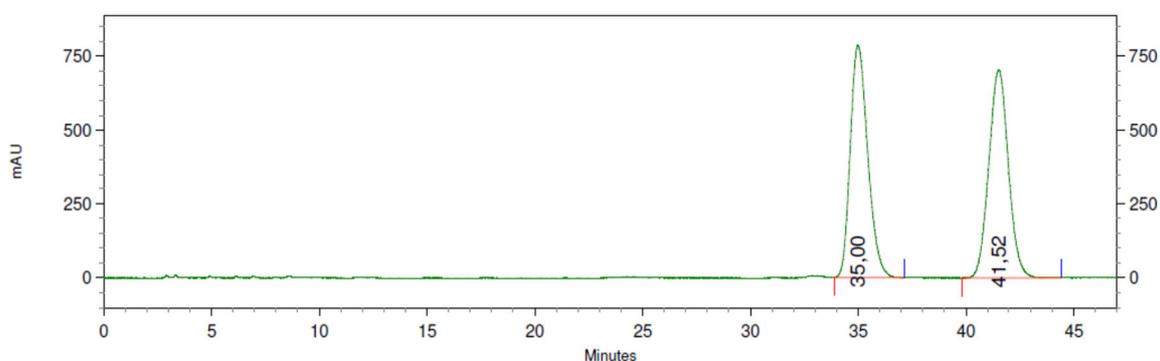
**Datos espectroscópicos de 63:**  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.94 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-2 Ph), 7.58 (1H, dd,  $J = 9.1, 2.3$  Hz, H-6 Ph), 6.96-6.90 (1H, m, H-3'), 6.76 (1H, d,  $J = 9.2$  Hz, H-5 Ph), 5.25 (1H, aparente d,  $J = 7.9$  Hz, H-1'), 4.25 (1H, m,

H-6'), 2.96 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz, H-4), 2.71 (3H, s, *NMe*), 2.43–2.27 (2H, m, H-4'), 2.36 (3H, s, *COMe*), 2.31 y 1.86 (2H, m, H-8' y H'-8'), 1.85–1.72 (4H, m, H-5', H-7'), 1.56 (2H, m, H-2), 0.90 (3H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-3);  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.4 (*COMe*), 145.6 (C-2'), 144.3 (C-3'), 141.6 (C-4 Ph), 137.4 (C-3 Ph), 131.3 (C-6 Ph), 126.5 (C-2 Ph), 125.2 (C-1 Ph), 119.1 (C-5 Ph), 58.3 (C-1'), 57.2 (C-6'), 51.9 (C-1), 34.7 (*NMe*), 31.3 (C-8'), 30.9 (C-7'), 28.8 (C-5'), 25.8 (*COMe*), 24.6 (C-4'), 21.1 (C-2), 11.2 (C-3); **EMAR** (ES)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  422.1744, encontrada 422.1740.

### 5.5.2.2 Separación de los enantiómeros de AN-DM



La mezcla racémica de AN-DM obtenida en el apartado anterior, ( $\pm$ )-**63**, se separó por HPLC con columna quiral, tal como se describe a continuación. La mezcla racémica de **63** se inyectó a una concentración de 12 mg/mL en una columna semi-preparativa quiral marca DIACEL™ serie AD-H acondicionada a un flujo de 10 mL/min y presión de 50 bar, con el detector UV del equipo de HPLC ajustado a una longitud de onda de 380 nm. Después de equilibrar la columna con hexano-isopropanol (90:10), se realizó la inyección de la mezcla racémica (0.5 mL por inyección) para obtener el primer enantiómero de AN-DM **63a** a un tiempo de retención de 35 min, y el segundo **63b** a un  $t_R = 41.5$  min (ver **Figura 5.3**).



**Figura 5.3.** Cromatograma de HPLC quiral de la mezcla racémica de AN-DM (**63**)

Se separaron un total de 25.0 mg de la mezcla racémica de **63**, que proporcionaron, después de reunir y concentrar a presión reducida las fracciones

conteniendo cada uno de los enantiómeros, 12.4 mg del enantiómero menos polar, **63a**, y 12.3 mg del enantiómero más polar, **63b**. Cada enantiómero se redisolvió en  $\text{CHCl}_3$  para medir por polarimetría la rotación específica,  $[\alpha]_D$ , ajustando la concentración a la indicada para cada uno en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Separación de los enantiómeros del derivado de anatoxina-a AN-DM

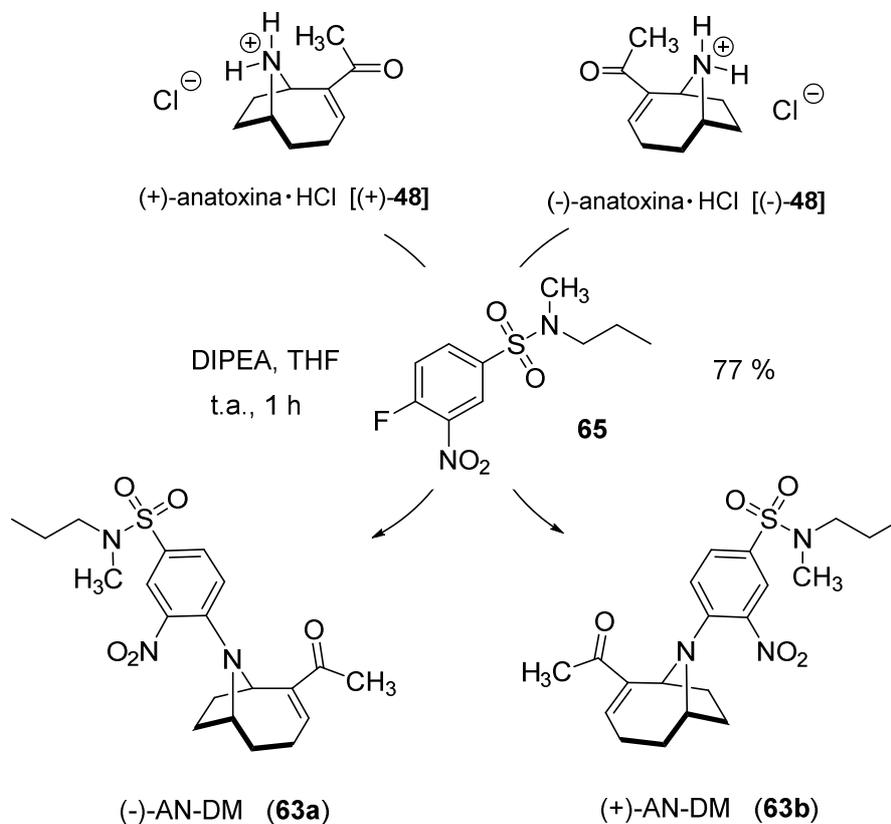
	$[\alpha]_D^{20}$	ee	$t_R$ (min)
<b>66a</b>	- 90.18 ( <i>c</i> 0.45, $\text{CHCl}_3$ )	> 99%	35.0
<b>66b</b>	+ 91.47 ( <i>c</i> 0.46, $\text{CHCl}_3$ )	> 99%	41.5

Con objeto de identificar la estereoquímica absoluta de cada uno de los enantiómeros de **63**, y en particular la del derivado correspondiente a la anatoxina-a natural, se llevó a cabo la síntesis de cada uno de ellos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, pero utilizando como material de partida cada uno de los enantiómeros de anatoxina-a preparados previamente, tal como se ha descrito anteriormente para la síntesis racémica de AN-DM.

El esquema de la síntesis de cada uno de los enantiómeros de **63** a partir del correspondiente enantiómero de anatoxina-a y los valores de la rotación específica medidos para cada uno de ellos se recogen en la **Figura 5.4**, junto con los tiempos de retención en HPLC, obtenidos en las mismas condiciones utilizadas previamente para la separación cromatográfica de la mezcla racémica de ambos.

La comparación de las rotaciones específicas de los enantiómeros de **63** obtenidos por síntesis a partir de los enantiómeros de anatoxina-a y por separación de la mezcla racémica, permite asignar de forma inequívoca la estereoquímica absoluta de estos últimos, tal como se recoge en la figura anterior, siendo el enantiómero levógiro, (-)-**63a**, con menor tiempo de retención, el que posee la misma estereoquímica absoluta que la anatoxina-a dextrógira natural, (+)-**48**.

**Figura 5.4.** Esquema de síntesis de ambos enantiómeros del derivado AN-DM (**63**) a partir de los correspondientes enantiómeros de anatoxina-a, valores de rotación específica y tiempos de retención en HPLC



	(-)-AN-DM ( <b>63a</b> )	(+)-AN-DM ( <b>63b</b> )
$[\alpha]_D^{20}$	- 86.0 ( <i>c</i> 0.43, CHCl <sub>3</sub> )	+ 71.0 ( <i>c</i> 0.18, CHCl <sub>3</sub> )
<i>ee</i>	> 99 %	> 99 %
<i>t<sub>R</sub></i>	35.0 min	42.0 min
anatoxina-a de partida	(+)-anatoxina-a [(+)- <b>48</b> ]	(-)-anatoxina-a [(-)- <b>48</b> ]

## 5.6 Preparación de bioconjugados proteicos

### 5.6.1 Preparación de los bioconjugados de ANs

La preparación de los conjugados BSA-ANs y OVA-ANs precisó de una etapa previa de funcionalización de la proteína correspondiente, a través de un proceso que consistió en incorporar residuos tialquilicos a la proteína mediante la metodología del iminotiolano o reactivo de Traut que se describe a continuación.

**Funcionalización de la BSA.** A partir de una disolución de BSA de 15 mg/mL en tampón fosfato sódico 50 mM pH 8.0 con NaCl 150 mM y EDTA-Na<sub>2</sub> 10 mM, se

---

tomó una alícuota de 1.9 mL (0.43  $\mu$ mol), a la cual se adicionó por goteo lento un volumen de 100  $\mu$ L (18.16  $\mu$ mol) de una disolución acuosa de reactivo de Traut 182 mM (25 mg/mL) en agua. La relación molar inicial fue igual a 42.

A continuación, la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente en agitación suave durante 1 h y protegida de la luz.

**Funcionalización de la OVA.** De manera equivalente al de la proteína inmunizante, a 1.8 mL de una disolución de OVA (1.22  $\mu$ mol) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 8.0 con NaCl 150 mM y EDTA- $\text{Na}_2$  10 mM, se adicionaron por goteo lento 200  $\mu$ L (36.32  $\mu$ mol) de una disolución de Traut 182 mM. La mezcla reaccionante se incubó a temperatura ambiente en agitación suave durante 2 h, también protegida de la luz.

En ambos casos, y toda vez que se completó el tiempo de incubación correspondiente, los conjugados se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en 3 columnas acopladas de 5 mL, HiTrap Desalting Columns, utilizando como tampón de elución fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. Finalmente, tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que contenían la proteína modificada, se llevaron a una concentración final conocida (10 mg/mL para OVA-SH y 5 mg/mL para BSA-SH) con tampón de elución y se almacenaron a  $-20$  °C.

**Conjugación de anatoxina-a a las proteínas tioladas.** A 2.0 mL (0.15  $\mu$ mol) y 1.9 mL (0.43  $\mu$ mol) de la disolución de BSA-SH y OVA-SH recién obtenidas, se adicionó un volumen de 120  $\mu$ L (12  $\mu$ mol) y 100  $\mu$ L (20  $\mu$ mol), dividido en dos porciones, de una disolución de formiato de anatoxina-a ( $M_r=211.16$ ) en DMF anhidra a 100 y 200 mM para BSA-SH y OVA-SH, respectivamente. Las relaciones molares iniciales ( $RM_o$ ) de anatoxina-a respecto a la BSA tiolada y a la OVA tiolada, fueron de 80:1 y 46:1, respectivamente. A continuación, las disoluciones de reacción se incubaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz y en agitación suave durante 2 h. Posteriormente, los conjugados se purificaron por exclusión molecular en condiciones idénticas a las descritas en párrafos previos, y las fracciones de los conjugados purificados se ajustaron a concentraciones conocidas (1.5 mg/mL para BSA-ANs y 1.0 mg/mL para OVA-ANs) con tampón de elución; El conjugado BSA-ANs se esterilizó por filtración. Finalmente, para la estimación de la eficacia de la conjugación por espectrometría de masas, una alícuota de 100  $\mu$ L de cada conjugado se dializó y liofilizó. Este proceso también se realizó con una alícuota de las proteínas tioladas, sin conjugar con ANs.

### 5.6.2 Preparación de los bioconjugados de AN $n$ , AN $m$ y AN $c$

Todos los haptenos, en forma de ésteres de NHS, se conjugaron a las proteínas mediante reacción con los restos amino libres de los aminoácidos, fundamentalmente de las lisinas.

---

### 5.6.2.1 Preparación de los conjugados inmunogénicos con BSA

200  $\mu\text{L}$  de una disolución 50 mM del éster activo del hapteno en DMF se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 1.8 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. La reacción de conjugación se incubó durante 2 h con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los conjugados se purificaron por exclusión molecular en 3 columnas acopladas de 5 mL HiTrap Desalting Columns, utilizando como tampón de elución fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. Finalmente, tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que contenían los conjugados de BSA se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL con tampón de elución y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tras su esterilización por filtración.

Para determinar la carga hapténica conseguida, una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del conjugado BSA-hapteno purificado se dializó de manera similar a como se especificó anteriormente para los conjugados de ANs, el producto dializado se liofilizó, y el número de moléculas de hapteno acopladas por molécula de proteína se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF.

### 5.6.2.2 Preparación de los conjugados de ensayo

#### 5.6.2.2.1 Preparación de los conjugados de tapizado con OVA

A partir de una disolución 50 mM en DMF del hapteno activado, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se añadieron lentamente y con agitación constante a un volumen de 1.9 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. Después de 2 h de reacción en agitación lenta y a temperatura ambiente, se procedió a la purificación de los conjugados como se ha descrito para los conjugados de BSA. Las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0.01% (v/v) y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nuevamente, se preparó una alícuota del conjugado recién obtenido por diálisis y liofilización para calcular la eficiencia de la conjugación, en términos del número de haptenos acoplados a la proteína, por espectrometría de masas MALDI-TOF.

#### 5.6.2.2.2 Preparación de trazadores enzimáticos con HRP

A partir de una disolución 5 mM del hapteno activado en DMF, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 0.9 mL de una disolución de HRP a una concentración de 2.2 mg/mL en tampón carbonato 50 mM, pH 7.4. La reacción de conjugación se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los trazadores enzimáticos se purificaron siguiendo el procedimiento descrito y se tomó una alícuota de los mismos para la valoración de la carga hapténica sobre la enzima previo tratamiento de diálisis y liofilización. Los

---

trazadores se llevaron a concentraciones conocidas que oscilaron entre 250 y 650 µg/mL en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0.02% (p/v), y se almacenaron a 4 °C.

## 5.7 Producción de anticuerpos monoclonales

### 5.7.1 Inmunización de ratones

La estabulación y manipulación de los animales se realizó de acuerdo a las leyes y las directrices del Ministerio Español de Ciencia y Innovación (RD 1201/2005 y la Ley 32/2007) y de acuerdo con la directiva 2003/65/CE de la Unión Europea relativa a la protección de animales utilizados con fines experimentales o científicos. Para la inmunización se emplearon hembras de conejo *New Zealand* con peso promedio de 2.0 kg. En total se inocularon 10 conejos, dos con cada inmunógeno BSA-hapteno preparados a partir de los haptenos de anatoxina-a disponibles: AN $m$ , AN $n$ , AN $s$ , AN $c$  y AN $dm$ .

Para la inmunización se emplearon hembras de ratón *BALB/c* de entre 6 a 8 semanas de edad al inicio del proceso. En total se inmunizaron 20 ratones, cuatro con cada uno de los inmunógenos preparados: BSA-AN $s$ , BSA-AN $m$ , BSA-AN $n$ , BSA-AN $c$  y BSA-AN $dm$ . En cada dosis se administraron por vía intraperitoneal 100 µg de conjugado por ratón, en un volumen total inyectado de 200 µL. La primera inmunización se realizó administrando el inmunógeno emulsionado con el adyuvante de Freund completo en proporción 1:1 (v/v). Luego, en intervalos de 3 semanas, los ratones recibieron dos inmunizaciones adicionales, en las cuales los inmunógenos se emulsionaron con adyuvante de Freund incompleto. Al objeto de monitorear el proceso de inmunización, a los diez días de aplicada la 3ª inmunización se extrajo una muestra de sangre de los ratones inmunizados mediante sangrado submandibular. Finalmente, cuatro días antes de cada fusión celular, el ratón seleccionado recibió una dosis de refuerzo de 100 µg del correspondiente conjugado inmunizante diluido en PBS [1:1, (v/v)].

### 5.7.2 Obtención de antisueros de ratón

Las muestras de sangre extraídas a los ratones después de la 3ª inmunización se mantuvieron a 4 °C durante 24 h para facilitar la coagulación. Tras este tiempo, las muestras se centrifugaron 2 veces a 1200 rpm en una microcentrífuga Eppendorf durante 15 min. El suero recogido se diluyó 1/10 en PBS con timerosal al 0.01% (p/v) y se almacenó a 4 °C.

### 5.7.3 Fusiones celulares: generación de hibridomas

Las fusiones celulares con los ratones inmunizados se realizaron básicamente aplicando la metodología descrita por Nowinski y cols.,<sup>238</sup> que introduce ligeras

---

modificaciones respecto al procedimiento originalmente desarrollado por Köhler y Milstein en 1975.<sup>100</sup>

Una vez realizado el sacrificio de los ratones, se les extrajo el bazo, que se homogenizó con el émbolo de una jeringa estéril. Después de lisar los eritrocitos por choque osmótico con 1 mL de tampón de lisis durante 1 min en frío, los esplenocitos se lavaron dos veces con medio frío y se tamizaron para eliminar los coágulos formados.

En los días previos a la fusión, la línea de mieloma P3-X63-Ag8.653<sup>239</sup> había sido cultivada en medio DMEM suplementado [2 mM L-alanina-L-glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales, 25 µg/mL gentamicina, SBF 10% (v/v)], manteniendo las células en fase de crecimiento exponencial, de manera que el día de la fusión se dispusiera de un número celular suficiente.

Después de dos lavados con medio sin suero, las poblaciones celulares de linfocitos y mielomas se combinaron en una relación típicamente 4:1. Para la fusión propiamente dicha se empleó 1 mL de PEG 1500, el cual provoca la disolución parcial de las membranas, facilitando así la generación de células híbridas. Después de 1 min de incubación, la población celular se diluyó lentamente (4 min) con 13 mL de medio DMEM suplementado y, después de centrifugar, las células se re-suspendieron en medio DMEM suplementado con SBF 15% (v/v) y se distribuyeron en placas de cultivo de 96 pocillos (100 µL por pocillo) a una densidad celular de  $150 \times 10^3$  linfocitos por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad. Transcurridas 24 h, se añadió a cada pocillo 100 µL de medio HAT para la selección de hibridomas [DMEM suplementado con 100 µM de hipoxantina, 0.4 µM de aminopterina, 0.16 µM timidina, HFCS 1% (v/v), SBF 20% (v/v)].

#### **5.7.4 Selección, clonación y conservación de hibridomas**

Típicamente 11 días después de la fusión celular, se realizó la evaluación de los sobrenadantes de los pocillos sembrados para identificar cuáles contenían hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer los analitos correspondientes (anatoxina-a o anatoxina-a derivatizada) tanto en su forma conjugada (hibridomas positivos) como libre (hibridomas competitivos). Previamente, por inspección visual al microscopio se determinó la eficiencia de la fusión definida como el porcentaje de pocillos que presentaban al menos un clon claramente visible.

La identificación de los hibridomas de interés se llevó a cabo mediante ELISA diferencial,<sup>105</sup> que consiste en analizar cada sobrenadante de cultivo mediante ELISA indirecto tanto en ausencia de analito como en presencia de una concentración conocida del mismo. Para ello, las placas se tapizaron con el conjugado homólogo a una concentración de 0.1 µg/mL, y se adicionó 50 µL por pocillo de PBS en las

---

columnas impares y 50  $\mu$ L por pocillo de una disolución de analito 200 nM en PBS en las columnas pares. La etapa competitiva se realizó añadiendo a cada dos pocillos contiguos 50  $\mu$ L de cada sobrenadante de cultivo. De esta forma, la concentración final de analito en el ensayo fue de 100 nM. Las condiciones para el formato de ELISA indirecto se detallan en el **apartado 5.8.1**.

A continuación, se seleccionaron aquellos pocillos que contenían hibridomas productores de anticuerpos que proporcionaron una señal de absorbancia igual o superior a 0.5 en ELISA no competitivo (pocillos positivos) e inhibición de la señal igual o superior al 50% en el ELISA competitivo (pocillos competitivos). Adicionalmente, para todos los pocillos positivos con señales altas se llevó a cabo un segundo ensayo más exhaustivo en modo bidimensional competitivo con el fin de garantizar la selección de los mejores hibridomas.<sup>224,226</sup> En el caso de las fusiones celulares de los ratones inmunizados con los inmunógenos BSA-AN<sub>c</sub> y BSA-AN<sub>m</sub>, el sobrenadante de cada hibridoma se ensayó a cuatro diluciones en placas tapizadas con el conjugado homólogo a 0.1 y 0.01  $\mu$ g/mL, y utilizando como competidor anatoxina-a racémica a 0, 10 y 100 nM en ensayo. Los sobrenadantes de las fusiones con el inmunógeno BSA-AN<sub>dm</sub> se ensayaron también a 4 diluciones, pero en placas tapizadas con OVA-AN<sub>dm</sub> sólo a 0.1  $\mu$ g/mL y utilizando como competidor anatoxina-a derivatizada o el hapteno AN<sub>dm</sub>, ambos analitos a 0, 25 y 250 nM en ensayo.

Las células de los pocillos seleccionados se clonaron por el método de dilución límite, sembrando a partir de cada pocillo una nueva placa de 96 pocillos a 2 células por pocillo en medio HT, de igual composición que el HAT pero sin aminopterina.

Entre 7 y 10 días después de la clonación celular, se identificaron por inspección visual los pocillos que contenían un único clon, evaluándose nuevamente el sobrenadante de cultivo de la misma manera que se ha descrito previamente para los sobrenadantes de fusión. Este proceso se realizó tantas veces como fue necesario (al menos dos) para asegurar la monoclonalidad de los hibridomas seleccionados, así como su estabilidad.

Por último, se procedió a la expansión de las líneas celulares seleccionadas, cultivando progresivamente el hibridoma en recipientes de mayor volumen. Una vez crecido el clon, las células se congelaron en nitrógeno líquido a una concentración de  $10^7$  células por vial (2-4 viales para cada hibridoma) en una disolución de SBF con DMSO 10% (v/v) como agente crioprotector. Los viales se mantuvieron a  $-80$  °C en el interior de una caja de poliestireno durante 24 h, y posteriormente se pasaron al contenedor de nitrógeno líquido.

### 5.7.5 Producción y purificación de anticuerpos monoclonales

En la última fase de la expansión de los hibridomas, éstos se dividieron progresivamente en placas de cultivo hasta alcanzarse un volumen final comprendido entre 100 y 150 mL de sobrenadante. Se dejaron crecer las células hasta alcanzar la confluencia celular, y una vez agotados los nutrientes del medio se procedió a recoger el contenido de las placas. El volumen recogido se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se precipitó mediante la adición de un volumen de una disolución saturada de sulfato amónico, manteniéndose a 4 °C hasta su purificación.

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad con columnas de proteína G siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este propósito, el anticuerpo precipitado se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm (4000xg) y se desechó el sobrenadante. El precipitado que contenía los anticuerpos monoclonales se redisolvió con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.4 y se filtró con membranas de nitrocelulosa (0.45 µm de diámetro de poro) para eliminar partículas en suspensión. A modo de control se recogieron 500 µL de la disolución filtrada sin purificar y se almacenaron a 4 °C (en caso de ausencia de actividad del anticuerpo tras la purificación, el análisis de esta fracción no purificada podría indicar si tal pérdida habría sido consecuencia de dicho proceso). La elución del anticuerpo de la columna se realizó con tampón citrato sódico 100 mM, pH 2.5. Las fracciones (volúmenes de 1 mL) que contenían el anticuerpo se recolectaron sobre 50 µL de tampón Tris-HCl 1M, pH 9.5, se juntaron y se cambió el tampón por fosfato sódico 20 mM, pH 7.4 mediante la utilización de unidades Amicon de Millipore.

Finalmente, se determinó por espectrofotometría UV la concentración de cada anticuerpo purificado [ $A_{280}(1 \text{ mg/mL IgG}) = 1.4$ ] y se preparó una disolución de trabajo a una concentración de 500 µg/mL en PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0.01% (p/v), que se almacenó a 4 °C. La disolución restante se precipitó con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)], lo que garantiza su estabilidad a 4 °C durante años.<sup>240</sup>

## 5.8 Inmunoensayos para la detección de anatoxina-a

### 5.8.1 ELISA competitivo de conjugado inmovilizado (formato indirecto)

Las placas de ELISA de 96 pocillos se tapizaron con 100 µL del conjugado OVA-hapteno correspondiente (homólogo y/o heterólogo) en tampón de tapizado, a temperatura ambiente durante toda la noche. Las concentraciones de tapizado se indican específicamente en cada apartado de la sección de resultados y discusión, siendo habitualmente 1.0 o 0.1 µg/mL. Al día siguiente las placas se lavaron cuatro veces con disolución de lavado, añadiéndose a continuación 50 µL por pocillo de

una disolución de analito diluida de manera seriada en PBS (curva patrón), más 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de una disolución de anticuerpo primario (mAb) en PBST. Después de 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron como se ha descrito previamente. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de una dilución 1/2000 en PBST del anticuerpo secundario marcado con HRP, y las placas se incubaron 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron nuevamente. La generación de la señal se llevó a cabo mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de disolución de revelado, preparada inmediatamente antes de ser utilizada. La reacción enzimática se detuvo a los 10 min por adición de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de la disolución de parada.

### 5.8.2 ELISA competitivo de anticuerpo inmovilizado (formato directo)

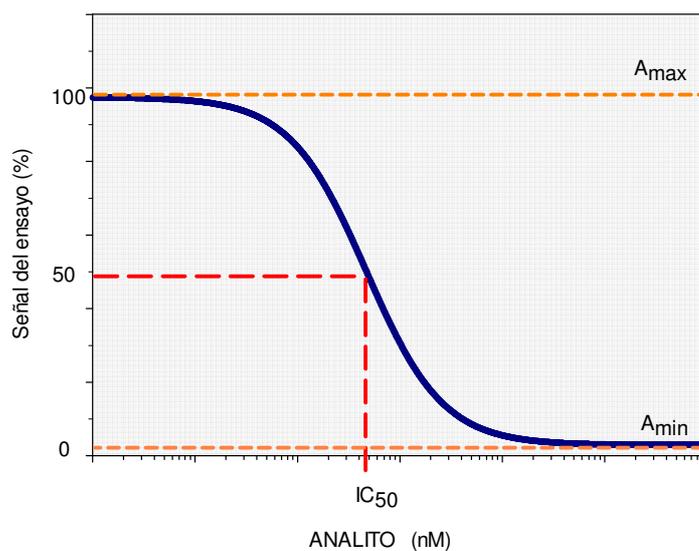
En este formato los anticuerpos se inmovilizaron directamente sobre las placas de poliestireno mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de una disolución 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mAb en tampón de tapizado. Las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se lavaron. A continuación, se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de la curva estándar de analito en PBS y 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de disolución de trazador enzimático en PBST (homólogo y/o heterólogo). Tras un periodo de incubación de 1 h se lavaron las placas y se generó la señal como se ha descrito en el apartado anterior para el formato indirecto.

### 5.8.3 Procesamiento de la señal y curvas de inhibición

La señal del ensayo se monitorizó espectrofotométricamente en modo dual a 492 nm empleando 650 nm como longitud de onda de referencia. Los valores de absorbancia de las curvas de inhibición obtenidos a partir de los ensayos competitivos se representaron frente al logaritmo de la concentración de analito, ajustándolos matemáticamente con el programa SigmaPlot 12.3 a la siguiente ecuación sigmoide de cuatro parámetros:<sup>241</sup>

$$y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde  $y$  es el valor de absorbancia obtenido frente a una concentración  $x$  de analito;  $A$  es la asíntota máxima [absorbancia obtenida en ausencia de analito ( $A_{max}$ )];  $B$  es la pendiente de la curva en el punto de inflexión;  $C$  es la concentración de analito en el punto de inflexión; y  $D$  es el valor de la asíntota mínima [el ruido de fondo ( $A_{min}$ )] (Figura 5.5). El parámetro  $C$ , también denominado  $IC_{50}$  por coincidir habitualmente con la concentración de analito que produce una inhibición de la señal de máxima del 50%, es uno de los parámetros más importantes de la curva, puesto que se le suele adoptar como estimación de la afinidad del anticuerpo hacia el analito o de la sensibilidad del ensayo, siendo éste tanto más sensible cuanto menor sea el valor de este parámetro.



**Figura 5.5.** Curva de inhibición típica donde se indican algunos parámetros

Adicionalmente, en aquellos casos en los que se consideró necesario, los valores de absorbancia de cada curva particular se normalizaron con respecto al valor de la absorbancia experimental obtenida en ausencia de analito ( $A_0$ ), para facilitar la comparación de diferentes inmunoensayos. Los valores de la absorbancia normalizada se calcularon con la ecuación 2 y los datos se expresaron en términos de valor absoluto a la unidad.

$$A_{norm} = A_{experimental} / A_0 \quad \text{Ecuación 2.}$$



---

## 7. REFERENCIAS

---

1. [www.efsa.europa.eu/en/factsheet/docs/reporten.pdf](http://www.efsa.europa.eu/en/factsheet/docs/reporten.pdf) (consulta, Septiembre 2015).
2. <http://ec.europa.eu/food/safety/rasff> (consulta, Septiembre 2015).
3. Pita, R., Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R. Neurotoxinas con actividad anticolinesterásica y su posible uso como agentes de guerra. *Med. Clin. (Barc)* **2003**, *121*, 511-517.
4. Lucena, E. Aspectos sanitarios de las cianotoxinas. *Hig. Sanid. Ambient.* **2008**, *8*, 291-302.
5. Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ. Int.* **2007**, *33*, 1070-1089.
6. Holland, A. and Kinnear, S. Interpreting the Possible Ecological Role(s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2239-2258.
7. Kaushik, R. and Balasubramanian, R. Methods and Approaches Used for Detection of Cyanotoxins in Environmental Samples: A Review. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* **2013**, *43*, 1349-1383.
8. Rellán, S., Osswald, J., Saker, M., Gago-Martinez, A., Vasconcelos, V. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 2189-2195.
9. Richardson, S. D. and Ternes, T. A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2813-2848.
10. Rawn, D. F. K., Niedzwiadek, B., Lau, B. P.-Y., and Saker, M. Anatoxin-a and Its Metabolites in Blue-Green Algae Food Supplements from Canada and Portugal. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 776-779.
11. Teixeira, M. G. L. C., Costa, M. C. N., Carvalho, V. L. P., Pereira, M. S., Hage, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO*, **1993**, *27*, 244-253.
12. Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* **2002**, *181-182*, 441-446.
13. Carmichael, W. W., Azevedo, S. M. F. O., An, J. S., Molica, R. J. R., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for Cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 663-668.
14. Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M. F., Park, H. D., Chen, G. C., Chen, G., and Yu, S. Z. Detection of microcystins, a bluegreen algal hepatoin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1317-1321.
15. Vasconcelos, V. M. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese fresh waters. *Arch. Hydrobiol.* **1994**, *130*, 439-451.
16. Hoagland, P., Scatista, S. The economic effects of harmful algal blooms. *Ecol. Harm. Algae* **2006**, *189*, 391-402.

- 
17. Zhang, Ch., and Zhang, J. Current Techniques for Detecting and Monitoring Algal Toxins and Causative Harmful Algal Blooms. *J. Environ. Anal. Chem.* **2015**, *2*, 123.
  18. Haigh, N. and Esenkubuas, S. Economics losses to The British Columbia Salmon aquaculture industry due to harmful Algal blooms, 2009-2012. *Pices Sci. Rep.* **2014**, *47*, 2-6.
  19. <http://www2.epa.gov/nutrient-policy-data/cyanohabs>. (consulta, septiembre, 2015)
  20. Kotak, B. G. and Zurawell, R. W. Cyanobacterial toxins in Canadian freshwaters: A review. *Lake and Reservoir Management* **2007**, *23*, 109-122.
  21. Spivak, C. E., Waters, J., Witkop, B., Albuquerque, E. X. Potencies and channel properties induced by semirigid agonists at frog nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **1983**, *23*, 337-43.
  22. Swanson, K. L., Allen, C. N., Aronstam, R. S., Rapoport, H., Albuquerque, E. X. Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 250-257.
  23. Rantala-Ylinen, A., Kana, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M., Sivonen, K. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7271-7278.
  24. Hillborn, E. D., and Beasley, V. R. One Health and Cyanobacteria in Freshwater Systems: Animal Illnesses and Deaths Are Sentinel Events for Human Health Risks. *Toxins* **2015**, *7*, 1374-1394.
  25. <http://news.Yahoo.com/culprit-mysterious-elk-deaths-found-175716999>, (consulta, Noviembre 2013).
  26. Ibelings. B. W., Backer, L. C., Kardinaal, E. A., Chorus, I. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. *Harmful Algae* **2014**, *40*, 63-74.
  27. Graham, J. L., Loftin, K. A., Meyer, M. T., Ziegler, A. C. Cyanotoxin Mixtures and Taste-and-Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 7361-7368.
  28. Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J. C., Humbert, J. F., Guette, C., Bernard, C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favorusum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* **2005**, *45*, 919-928.
  29. Rodríguez, I., Alfonso, C., Alfonso, A., Otero, P., Meyer, T., Breitenbach, U., Botana, L. M. Toxin profile in samples collected in fresh and brackish water in Germany. *Toxicon* **2014**, *91*, 35-44.
  30. Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., and Andrinolo, D. An Acute Case of Intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2164-2175.
  31. Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G. R., Connell, D. W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, *163*, 113-186.
  32. Hitzfeld, B. C., Höger, S. J., Dietrich, D. R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 113-122.

- 
33. [http://www.oregonlakes.org/Lake\\_Wise\\_Current\\_Issue#TheoArticle](http://www.oregonlakes.org/Lake_Wise_Current_Issue#TheoArticle) (consulta, octubre 2015).
  34. <http://www.doh.wa.gov/Portals/1/Documents/4400/334-177-recguide.pdf> (consulta, julio 2015).
  35. Ibelings, B. W., Chorus, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater seafood and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut.* **2007**, *150*, 177-192.
  36. Chorus, I. Current Approaches to Cyanotoxin Risk Assessment, Risk Management and Regulations in Different Countries. Umweltbundesamt, Berlin **2012**.
  37. Koskinen, A. M. P. and Rapoport, H. Synthetic and Conformational Studies on Anatoxin-a: A Potent Acetylcholine Agonist. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1301-1309.
  38. Harada, K. I., Nagai, H., Kimura, Y., Suzuki, M., Park, H., Watanabe, M. F. Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a, a neurotoxin from cyanobacteria. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9251-60.
  39. Stevens, D. K., and Krieger, R. I. Stability Studies on the Cyanobacterial nicotinic Alkaloid Anatoxin-a. *Toxicon* **1991**, *29*, 169-179.
  40. Smith, C., and Sutton, A. The persistence of anatoxin-a in reservoir water. In: Foundation for Water Research, UK Report No. FR0427, **1993**.
  41. Kaminski, A., Bober, B., Lechowski, Z., Bialczyk, J. Determination of anatoxin-a stability under certain abiotic factors. *Harmful Algae* **2013**, *28*, 83-87.
  42. Merel, S., Clement, M., Thomas, O. State of the art on Cyanotoxins in water and their behavior towards chlorine. *Toxicon* **2010**, *55*, 677-691.
  43. [http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/solutios/advisory/crm/biotoxins/list\\_products.html](http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/solutios/advisory/crm/biotoxins/list_products.html), (Junio 2014).
  44. Acevedo, J., Osswald, J., Guihermino, L., Vasconcelos, V. Development and validation of an SPE-HPLC-FL method for the determination of anatoxin-a in water and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 1431-1441.
  45. Al-Sammak, M. A., Hoagland, K. D., Snow, D. D., Cassada, D. Methods for simultaneous detection of the Cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples. *Toxicon* **2013**, *76*, 316-325. También se puede consultar: Al-Sammak, M. A., Hoagland, K. D., Cassada, D., Snow, D. D. Co-occurrence of the Cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in Nebraska Reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxin* **2014**, *6*, 488-508.
  46. Vasas, G., Páger, G. A., Surányi, G., Máthé, C., Hamvas, M. M., Borbely, G. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 108-115.
  47. Aráoz, R., Guerineau, V., Rippka, R., Palibroda, N., Herdman, M., Laprevote, O. MALDI-TOF-MS detection of the low molecular weight Neurotoxins anatoxin-a and Homoanatoxin-a on lyophilized and fresh filaments of axenic *Oscillatoria* strains. *Toxicon* **2008**, *51*, 1308-1315.
  48. Klinker, Ch. C., and Bowser, M. 4-Fluoro-7-2,1,3-benzoxadiazole as a Fluorogenic Labeling Reagent for the in Vivo Analysis of Amino Acid Neurotransmitters Using Online Microdialysis-Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8747-8754.
  49. Namera, A., So, A., Pawliszyn, J. Analysis of anatoxin-a in aqueous samples by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-fiber Derivatization. *J. Chromatogr. A*, **2002**, *963*, 295-302.

- 
50. Rellán, S., and Gago-Martínez, A. Improved conditions for the application of solid phase microextraction prior to HPLC-FLD analysis of anatoxin-a. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 2522-2528.
51. Gao, S., Zhang, Z. P., Karnes, H. T. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using Derivatization and mobile phase additives. *J. Chromatogr. B.* **2005**, *825*, 98-110.
52. Rodríguez, V., Yonamine, M., Pinto, E. Determination of anatoxin-a in Environmental water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2085-2090.
53. Zotou, A., Jefferies, T. M., Brough, P. A., Gallagher, T. Determination of anatoxin-a and homoanatoxin en blue-green algal extracts by high-performance liquid chromatography and gas chromatography – mass spectrometry. *Analyst* **1993**, *118*, 753-758.
54. Takino, M., Daishima, S., Yamaguchi, K., Analysis of anatoxin-a in freshwaters by automated on-line Derivatization-liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *862*, 191-197.
55. Carmichael, W. W., Yuan, M., Friday, C.F. Human mortality from accidental ingestion of toxic cyanobacteria-a case re-examined. *Sixth International Conference on Toxic Cyanobacteria*.pp. 61, **2004**.
56. EPA Method 545 – Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS); August **2013**.
57. Engvall, E., Perlmann, P. Enzyme-Linked Labelled Immunosorbent, Assay (ELISA). III. Quantitation of specific Antibodies by Enzyme Labelled Antiimmunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *J. Immunol. Meth.* **1971**, *10*, 161-170.
58. Van Weeman, B. L., Schuurs, A. H. W. M. Immunoassay Using Antigen Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.* **1971**, *15*, 232-236.
59. Avrameas, S., Uriel, J. Méthode de Marquage d'Antigènes et d'Anticorps avec des Enzymes et son Application en Immuno-Diffusion. *C. R. Acad. Sci.* **1966**, *262*, 2543- 2545.
60. Nakane, P. K., and Pierce, G. B. Enzyme-Labelled Antibodies. Preparation and Application for the Localization of Antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **1966**, *14*, 929-931.
61. <http://cfpub.epa.gov/ncer/abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/7932/report/F> (consulta, Octubre 2015)
62. [http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti\\_id=7226939](http://www.osti.gov/energycitations/product.biblio.jsp?osti_id=7226939) (consulta, Octubre 2015)
63. Chorus, I. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Dessau, Germany: Federal Environmental Agency, (Umweltbundesamt). ISBN 0175-4211, 122 pp., 2005. Available online at: <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/2910.pdf>
64. Int. Pat. FR2012050157, enero 24, 2012.
65. Marc, M., Outurquin, F., Renard, P. Y., Créminon, Franck, X. Synthesis of a (+)-anatoxin-a analogue for monoclonal antibodies production. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4554-4557.
- 66 Harlow, E., Lane, D. Antibodies. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor* **1988**.
-

- 
67. Landsteiner, K., Simms, S. Production of Heterogenetic Antibodies with Mixtures of the Binding Part of the Antigen and Protein. *J. Exp. Med.* **1923**, *38*, 127-138.
68. Vallejo, R. P., Bogus, E. R., Mumma, R. O. Effects of Hapten Structure and Bridging Groups on Antisera Specificity in Parathion Immunoassay Development. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 572-580.
69. Dankwardt, A. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ed. Robert A. Meyers, John Wiley & Sons Ltd, Chichester UK, **2001**, Immunochemical Assays in Pesticide Analysis, 1-27.
70. Tuomola, M., Harpio, R., Mikola, H., Knuutila, T., Lindstrom, M., Mikkala, V. M., Matikainen, M. T., Lovgren, T. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against a Very Small Hapten, 3-Methylindole. *J. Immunol. Methods* **2000**, *240*, 111-124.
71. Lee, J. K., Ahn, K. C., Park, O. S., Ko, Y. K., Kim, D. W. Development of a Immunoassay for the Residues of the Herbicide Bensulfuron-Methyl. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1791-1803.
72. Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. Synthesis of Site-Heterologous Haptens for High-Affinity Anti-Pyraclostrobin Antibody Generation. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1443-1453.
73. Schelaepi, J. M., Meyer, W., Ramsteiner, K. Determination of Triasulfuron in Soil by Monoclonal Antibody-Based Enzyme Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1093-1098.
74. Khreich, N., Lamourette, P., Renard, P. Y., Clavé, G., Fenaille, F., Créminon, C., Volland, H. A highly sensitive competitive enzyme immunoassay of broad specificity quantifying microcystins and nodularins in water samples. *Toxicol.* **2009**, *53*, 551-559.
75. Sanvicens, N., Pichon, V., Hennion, M. C., Marco, M. P. Preparation of Antibodies and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of Dealkylated Hydroxytriazines, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 156-164.
76. Szurdoki, F., Szekacs, A., Le, H., Hammock, B. Synthesis of Haptens and Protein Conjugates for the Development of Immunoassays for the Insect Growth Regulator Fenoxycarb. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 29-40.
77. Mercader, J. V., Abad-Fuentes, A. Monoclonal Antibody Generation and Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Evaluation for the Analysis of the Fungicide Fenhexamid in Must and Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5129-5135.
78. Yuan, J., Deng, D., Lauren, D. R., Aguilar, M. I., Wu, Y. Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Detection of Ochratoxin A in Cereals and Beverages. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *656*, 63-71.
79. Mansell, H. L. Synthetic Approaches to Anatoxin-a. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 17, 6025-6061.
80. Brenneman, J. B., Machauer, R., Martin, S. F. Enantioselective synthesis of (+)-Anatoxin-a via enine metathesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7301-7314. También se puede consultar: Brenneman, J. B. PhD Thesis. University of Texas at Austin, **2005**.
81. Parsons, P. J., Camp, N. P., Edwards, N., Sumoreeah L. R. Synthesis of (±)-Anatoxin-a and Analogues. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 309-315.
82. Sardina, F. J., Howard, M. H., Koskinen, A. M. P. y Rapoport, H. Chiroselective synthesis of nitrogen and side chain modified analogues of (+)-Anatoxin. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4654-4660.

- 
83. Wegge, T., Schwarz, S., Seitz, G. A new and efficient synthetic route to enantiopure (+)-Anatoxin-a from (-)- cocaine hydrochloride. *Tetrahedron: Asymmetric* **2000**, *11*, 1405-1410.
84. Tufariello, J. J., Meckler, H., Senaratne, K. P. A. Synthesis of Anatoxin-a: Very Fast Death Factor. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7979-7980.
85. Tufariello, J. J., Meckler, H., Senaratne, K. P. A. The Use of Nitrones in the Synthesis of Anatoxin-a, Very Fast Death Factor. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3447-3453.
86. Tufariello, J. J. Alkaloids from Nitrones. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 396-403.
87. Swanson, K. L., Aronstam, R. S., Wonnacott, S., Rapoport, H., and Albuquerque, E. X. Nicotinic pharmacology of anatoxin analogs II. Side chain structure-activity relationships at peripheral agonist and noncompetitive antagonist sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 377-386.
88. Fawell, J. F., and James, H. A. Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of anatoxin-a and a method for its determination in reservoir water. *FWR Report No.FR0492/DoE372*, **1994**.
89. Aracava, Y., Swanson, K. L., Rapoport, H., Aronstam, R. S., and Albuquerque, E. X. Anatoxin-a analog: Loss of nicotinic agonism and gain of antagonism at the acetylcholine-activated channels. *Fed. Proc.* **1987**, *46*, 861.
90. Costa, A. C. S., Swanson, K. L., Aracava, Y., Aronstam, R. S. y Albuquerque, E. X. Molecular effects of dimethylanatoxin on the peripheral nicotinic acetylcholine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *252*, 507-516.
91. Kanne, D. B., and Abood, L. Synthesis and biological characterization of pyridohomotropanes. Structure-Activity relationships of conformationally restricted nicotinoids. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 506-509.
92. Magnus, N. A., Ducry, L., Rolland, V., Wonnacott, S., Gallagher, T. Direct C-11 functionalization of Anatoxin-a. Application to the synthesis of new ligand-based structural probes. *J. Chem. Soc., Perk. Trans.* **1997**, *1*, 2313-2318.
93. Hernández, A., Rapoport, H. Conformationally Constrained Analogous of Anatoxin. Chiroselective Synthesis of s-Trans Carbonyl Ring-Fused Analogues. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1058-1066.
94. Mann, S., Cohen, M., Chapuis-Hugon, F., Pichon, V., Mazmouz, R., Méjean, A., Ploux, O. Synthesis, configuration assignment, and simultaneous quantification by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, of dihydroanatoxin-a and dihydrohomoanatoxin-a together with the parent toxins, in axenic cyanobacterial strains and in environmental samples. *Toxicon* **2012**, *60*, 1404-1414.
95. Abad, A., Manclús, J. J., Mojarrad, F., Mercader, J. V., Miranda, M. A., Primo, J., Guardiola, V., Montoya, A. Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to DDT and Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3694-3702.
96. Gueguen, F., Boisdé, F., Queffelec, A. L., Haelters, J. P., Thouvenot, D., Corbel, B., Nodet, P. Hapten Synthesis for the Development of a Competitive Inhibition Enzyme-Immunoassay for Thiram. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4492-4499.
97. Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: San Diego, **1996**.
-

- 
98. Montalbetti, C. A. G. N., and Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
99. Ramón-Azcón, J., Sánchez-Baeza, F., Savidens, N., Marco, M. P. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Determination of the Miticide Bromopropylate. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 375-384.
100. Esteve-Turrillas, F. A., Abad-Somovilla, A., Quiñones-Reyes, G., Agulló, C., Mercader, J. V., Abad-Fuentes, A. Monoclonal antibody-based immunoassays for cyprodinil residue analysis in QuEChERS-based fruit extracts. *Food Chemistry* **2015**, *187*, 530-536.
101. Köhler, G., Milstein, C. Continuous Cultures of Fuse Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
102. Krämer, K., Hock, B. Recombinant Antibodies for Environmental Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 417-426.
103. Sheedy, C., MacKenzie, C. R., Hall, J. C. Isolation and affinity Maturation of Hapten-specific Antibodies. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 333-352.
104. Li, T., Cheng, J., Hu, B., Liu, Y., Qian, G., Liu, F. Construction, Production, and Characterization of Recombinant scFv Antibodies Against Methamidophos Expressed in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 867-874.
105. Kobayashi, M., Oyama, H., Kato, Y., Goto, J., Soderlind, E., Borrebaeck, C. A. Two-Step *in vitro* Antibody Affinity Maturation Enables Estradiol-17 beta Assays with more than 10-Fold Higher Sensitivity. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1027-1038.
106. Abad, A., Montoya, A. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1818- 1823.
107. González-Techera, A., Varell, L., Last, J. A., Hammock, B. D., González-Sapienza, G. Phage Anti-Immune Complex Assay: General Strategy for Non Competitive Immunodetection of Small Molecules. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7799-7806.
108. Girotti, S., Eremin, S., Montoya, A., Moreno, M. J., Caputo, P., D' Elia, M., Ripani, L., Romolo, F. S., Maiolini, E. Development of a Chemiluminescent ELISA and a Colloidal Gold-Based LFIA for TNT detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 687-695.
109. Li, Z. Z., Gong, F. C. Renewable Fluorimetric Enzyme Immunosensing System using Prochlorperazine as the Substrate for Horseradish Peroxidase for the Determination of Transferrin. *Sens. Actuators B* **2004**, *99*, 562-567.
110. Stanker, L. H., Beier, R. C. Introduction to Immunoassays for Residue Analysis: Concepts, Formats, and Applications. *Immunoassays or Residue Analysis. Food Safety*. American Chemical Society: Washington D. C. **1996**, *621*, 2-16.
111. Shan, G., Lipton, C., Gee, S. J., Hammock, B. D. In *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, ed. Philip W. Lee, John Wiley & Sons, Inc., **2002**, Immunoassays, Biosensors and other Non-Chromatographic Methods, 623-679.
112. Moreno, M. J., Plana, E., Montoya, A., Caputo, P., Manclús, J. J. Application of a Monoclonal-Based Immunoassay for the Determination of Imazalil in Fruit Juices. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 704-712.
-

- 
- 113 Abad, A., Primo, J., Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassays Formats. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1486-1494.
114. Marco, M. P., Gee, S., Hammock, B. D. Immunochemical Techniques for Environmental Analysis. II. Antibody Production and Immunoassay Development. *Trends. Anal. Chem.* **1995**, *14*, 341-350.
115. Holthues, H., Pfeifer-Fukumura, U., Sound, I., Baumann, W. Evaluation of the Concept of Heterology IN A Monoclonal Antibody-Based ELISA utilizing Direct Linkage to Polystyrene Microtiter Plates. *J. Immunol. Methods* **2005**, *304*, 68-77.
116. Esteve-Turrillas, F. A., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. Moiety and linker site heterologies for highly sensitive immunoanalysis of cyprodinil in fermented alcoholic drinks. *Food Control* **2015**, *50*, 393-400.
117. Goodrow, M. H., Saborn, J. R., Stoutamire, D. W., Gee, S. J., Hammock, B. D. Strategies for Immunoassay Hapten Design. *Immunoanalysis of Agrochemicals*, Capítulo 9, **1995**, 119-139. DOI: 10.1021/bk-1995-0586.ch009
118. Leenaards, M., and Hendriksen, C. F. M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR Journal* 2005, *46*, 269-279.
119. Parra, J., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. Concise and Modular Synthesis of Regioisomeric Haptens for the Production of High-affinity and Stereoselective Antibodies to the Strobilurin Azoxystrobin. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 624-635.
120. LoPachin, R. M., Barber, D. S., Gavin, T. Molecular Mechanisms of the Conjugated  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl Derivatives: Relevance to Neurotoxicity and Neurodegenerative Diseases. *Toxicol Sci.* **2008**, *104*, 235-249.
121. Chu, Ch. M., Gao, S., Sastry, M. N. V., Kuo, Ch. W., Lu, Ch., Liu, J. T., Yao, Ch. F. Ceric ammonium nitrate (CAN) as a green and highly efficient promoter for the 1,4-addition of thiols and benzeneselenol to  $\alpha,\beta$ -unsaturated Ketones. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1863-1871.
122. Movassagh, B., and Shaygan, P. Michael addition of thiols to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carbonyl compounds under solvent-free conditions. *ARKIVOC* **2006**, *12*, 130-137.
123. Nilsson, A. M., Bergström, M. A., Luthman, K., Nilsson, J. L. G., Karlberg, A. T. An  $\alpha,\beta$ -unsaturated oxime identified as a strong contact allergen Indications of antigen formation via several pathways. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1627-1636.
124. Karu, A. E., Goodrow, M. H., Schmidt, D. J., Hammock, D., Bigelow, M. W. Synthesis of Haptens and Derivation of Monoclonal Antibodies for Immunoassay for the Phenylurea Herbicide Diuron. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 301-309.
125. Ino, A., Dickerson, T. J., and Janda, K. D. Positional linker effects in haptens for cocaine immunopharmacotherapy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4280-4283.
- 126 Codd, G. A., Morrison, L. F., and Metcalf, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *203*, 264-272.
127. Rellán, S., Osswald, J., Vasconcelos, V., Gago-Martínez, A. Analysis of anatoxin-a in biological samples using liquid chromatography with fluorescence detection after solid phase extraction and solid phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1156*, 134-140.
-

- 
128. Rosenfeld, J. M. Derivatization in the current practice of analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 785-798.
129. Casas Ferreira, A. M., Fernández Laespada M. E., Pérez Pavón J. L., Moreno Cordero, B. *In situ* aqueous derivatization as sample preparation technique for gas chromatographic determinations. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1296*, 70-83.
130. Santa, T., Al-Dirbashi, O. Y., Fukushima, T. Derivatization reagents in liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for biomedical analysis. *Drug Discov. Ther.* **2007**, *1*, 108-118.
131. Lee, E. A., Zimmerman, L. R., Bhullar, B. S., Thurman, E. M. Linker-Assisted Immunoassay and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Glyphosate. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4937-4943.
132. Morel, A. M., Delaage, M. A. Immunoanalysis of histamine through a novel chemical derivatization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1988**, *82*, 646-654.
133. Singh, A. K., Kilpatrick, P. K., and Carbonell, R. G. Application of Antibody and Fluorophore-Derivatized Liposome to Heterogeneous immunoassays for D-dimer. *Biotechnol. Prog.* **1996**, *12*, 272-280.
134. Klinker, C. C., Bowser, M. T. 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a Fluorogenic Labeling Reagent for the *in Vivo* Analysis of Amino Acid Neurotransmitters Using Online Microdialysis-Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8747-8754.
135. Crich, D., and Sharma, I. Epimerization-Free Block Synthesis of Peptides from Thioacids and amines with the Sanger and Mukaiyama Reagents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2355-2358.
136. Razak, A. O., Belal, S. F., Bedair, M. M., Barakat, N. S., Haggag, R. S. Spectrophotometric and polarographic determination of enalapril and lisinopril using 2,4-dinitrofluorobenzene. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 701-711.
137. El Walily, A. F. M., Razak, O. A., Belal, S. F., Bakry, R. S. Determination of norfloxacin spectrophotometrically using 2,4-dinitrofluorobenzene. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 1069-1076.
138. Hermanson, Greg T. *Bioconjugation Techniques*, Ed. Elsevier Inc., Academic Press, Third Edition, Rockford, ILL, USA, **2013**, Chapter 2, p. 167.
139. Traut, R. R., Bollen, A., Sun, T. T., Hershey, J. W. B., Sundberg, J., Pierce, R. Methyl 4-mercaptobutyrimidate as a cleavable cross-linking reagent and its application to the *Escherichia coli* 30S ribosome. *Biochem.* **1973**, *12*, 3266-73.
140. Tarentino, A. L., Phelan, A. W., and Plummer, T. H. Jr. 2-Iminoethanol: a reagent for the introduction of sulfhydryl groups into oligosaccharides derived from asparagine-linked glycans. *Glycobiology* **1993**, *3*, 279-85.
141. Wower, I., and Wower, J. The use of 2-iminoethanol as an RNA-protein cross-linking agent in *Escherichia coli* ribosomes, and the localization on 23S RNA of sites cross-linked to proteins L4, L6, L21, L23, L27 and L29. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 4285-302.
142. Erlanger, B. F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: A survey. *Methods Enzymol.* **1980**, *70*, 85-104.
-

- 
143. Hu, K., Huang, X., Jiang, Y., Qiu, J., Fang, W., Yang, X. Influence of hapten density on immunogenicity for anti-ciprofloxacin antibody production in mice. *BioScience Trends*. **2012**, *6*, 52-56.
144. Simoni, D., Rondanin, R., Marchetti, P., Rullo, C. Synthesis and biological activity of a novel class nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) ligands structurally related to anatoxin-a. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5423-5427.
145. M. Tanaka, M. Oba, T. Ichiki, H. Suemune. Solid-State Conformation of a Hybrid Tripeptide between  $\beta$ -Amino Acid; 8 Aminocyclooct-4-enecarboxylic Acid and 2-Aminoisobutyric Acid. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1178-1181.
146. Forró, E., Árva, J., and Fülöp, F. (1*S*, 8*R*)-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-one: potential starting compounds for the synthesis of anatoxin-a. *Tetrahedron: Asymmetric* **2001**, *12*, 643-649.
147. Toshimitsu, A., Terao, K., and Uemura, S. Intramolecular Amidoselenation of *N*-Alkenylamides: Formation of Nitrogen Heterocycles. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1724-1729.
148. Pannecoucke, X., Outurquin, F., and Paulmier, C. Synthesis of Azetidine and Pyrrolidine Derivatives through Selenium-Induced Cyclization of Secondary Homoallylamines—A <sup>77</sup>Se NMR Study. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 995-1006.
149. Tiecco, M., Testaferri, L., Tingoli, M., and Marin, F. *N*-hydroxy  $\gamma$ -lactams or cyclic *N*-hydroxylimidates from the Organoselenium-induced cyclization of  $\beta,\gamma$ -unsaturated hydroxamic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, *2*, 221-222.
150. Back, G. T., Birss, V. I., Edwards, M., Krihsna, M. V. Study of the Reductive Cleavage of Selenides with Nickel Boride. A Convenient Deselenization Procedure. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3815-3822.
151. Carroll, I. F., Hu, X., Navarro, H. A., Deschamps, J., Abdrakhmanova, G. R., Damaj, M. I., Martin, B. R. Synthesis and pharmacological characterization of nicotinic acetylcholine receptor properties of (+)- and (-)- pyrido- [3.4-*b*]homotropanes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3244-3250.
152. Barrell, M., and Apparau, M. Aminomercuration intramoléculaire d'aziridines cycloocténiques set de leurs Aminoalcools Precurseurs. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1309-1319.
153. Cheng, Ch., Sun, J., Xing, L., Xu, J., Wang, X., Hu, Y. Highly Chemoselective Pd-C Catalytic Hydrodechlorination Leading to the Highly Efficient *N*-Debenzylation of Benzylamines. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5671-5674.
154. Howarth, N., Malpass, J. R., and Smith, C. R. Manipulation of Substituents at Nitrogen in Tropanes, Homotropanes, and Dehydro- Derivatives. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10899-10914.
155. Brazidec, L. J. Y., Gilson, C. A., Boehm, M. F. Stereoselective synthesis of the C1-C13 fragment of 2, 3- Dihydrodorriginocin A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8212-8215.
156. Dueno, E., Chu, F., Kim, S. I., Jung, K. Cesium Promoted O-Alkylation of Alcohols for the Efficient Ether Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1843-1846.
157. Li, W. D. and Wang, X. W. Novel formal synthesis of cephalotaxine via a facile Friedel-Crafts cyclization. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1211-1214.
-

- 
158. Andersson, C. M. and Hallberg, A. Palladium-Catalyzed Vinylation of Alkyl Vinyl Ethers with Enol Triflates. A Convenient Synthesis of 2-Alkoxy 1,3-Dienes. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1502-1505.
159. Stang, P. J. Vinyl Triflate Chemistry: Unsaturated Cations and Carbenes. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 107-114.
160. Vaz, B., Domínguez, M., Álvarez, R., Lera, A. R. The Stille Reaction in the Synthesis of the C<sub>37</sub>-Norcarotenoid Butenolide Pyrroloxanthin. Scope and Limitations. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5914-5920.
161. Xuebin, L., Zhou, H., Yu, Jianming, and Cook, J. M. An Improved Total Synthesis of (+)-Macrolin and Alstonerine as Well as the Formal Total Synthesis of (-)-Talcarpine and (-)-Anhydromacrosalpine-methine. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8884-8890.
162. Lazny, R., Sienkiewicz, M., Olenski, T., Urbanczyk-Lipkowska, Z. Approaches to enantioselective synthesis of ferrugine and its analogues. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8236-8244.
163. Alves Benício, A. A., Da Silva, A. D., De Almeida, M. V., Da Silva, M. M., Gero, S. D. Stereoselective synthesis of 2,6-dideoxy; 3,6-dideoxy; 2,3,6-trideoxy-inositol 1,4,5-triphosphate and 6-deoxy-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate analogues from 6-deoxy-D-inositol precursors. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1161-1167.
164. Carroll, F. I., Abraham, P., Chemburkar, S., He, X. Ch., Mascarella, S. W., Kwon, Y. W., Triggler, D. J. Synthesis and Muscarinic Receptor Activity of Ester Derivatives of 2-Substituted 2-Azabicyclo[2.2.1]heptan-5-ol and 6-ol. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2184-2191.
165. Stang, P. J. Vinyl Triflate Chemistry: Unsaturated Cations and Carbenes. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 107-114.
166. Sharples, C. G. V., Karig, G., Simpson, G. L., Spencer, J. A., Wright, E., Millar, N. S., Wonnacott, S., Gallager, T. Synthesis and pharmacological characterization of novel analogues of the nicotinic acetylcholine receptor agonist (±)- UB -165. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3235-3245.
167. Arcadi A., Cacchi S., Marinelli, F. The conversion of vinyl triflates into  $\gamma$ '-hydroxy- $\alpha,\beta$ -enones. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4955-4964.
168. Mancuso, A. J., Swern, D. Activated Dimethyl Sulfoxide useful Reagents for Synthesis. *Synthesis* **1981**, *3*, 165-185.
169. Evans, G. B., Furneaux, R. H., Greatrex, B., Murkin, A. S., Schramm, V. L., Tyler, P. C. Azetidine Based Transition State Analogue Inhibitors of N-Ribosyl Hydrolases and Phosphorylases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 948-956.
170. Palkó, M., Benedek, G., Forró, E., Wéber, E., Hänninen, M., Sillanpää, R., Fülöp, F. Synthesis of mono- and dihydroxy-substituted 2-aminocyclooctanecarboxylic acid enantiomers. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 957-961.
171. Patent WO2012025811A1, 1 marzo 2012.
172. Marcovici-Mizrahi, D., Gottlieb, H. E., Marks, V., Nudelman, A. On the Stabilization of the *Syn*-Rotamer of Amino Acid Carbamate Derivatives by Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8402-8406.
-

- 
173. Moraczewski, A. L., Banaszynski, L. A., From, A. M., White C. E., Smith B. D. Using Hydrogen Bonding to Control Carbamate C-N Rotamer Equilibria, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7258-7262.
174. Hintermann, L., Labonne, A. Catalytic Hydration of Alkynes and Its Application in Synthesis. *Synthesis* **2007**, 1121-1150.
175. Chinchilla, R., Najera, C. The Sonogashira reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chem Rev.* **2007**, *107*, 874-922.
176. Enquist, J. A., Virgil, S. C., Stoltz, B. Total synthesis of cyanthiwiggins B, F, and G. *Chem. Eur. J.* **2011**, *36*, 9957-9969.
177. Nagumo, S., Ishii, Y., Sato, G., Mizukami, M., Imai, M., Kawahara, N., Akita, H. 8-Endo Selective Friedel-Crafts Cyclization of Vinyloxiranes with Co-2(Co)(6)-Complexed Acetylene. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 26-28.
178. Patent U.S. 6426364, 30 Julio 2002.
179. Klapans, A. and Buchwald, S. L. Cooper-catalyzed Halogen Exchange in Aryl Halides: An Aromatic Finkelstein Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14844-14845.
180. Cant, A. A., Bhalla, R., Pimlott, S. L. and Sutherland, A. Nickel-catalyzed aromatic reaction of aryl and heteroaryl bromides. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3993-3995.
181. Menashe, N., Reshef, D., Shvo, Y. J. The reaction of alkynes and formic acid. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2912.
182. Jennings, P. W., Hartman, J. W. and Hiscox, W. C. Alkyne hydration using Pt(II) catalyst. *Inorg. Chim. Acta* **1994**, *222*, 371-322.
183. Hennion, G. F., Killian, D. B., Vaughn, T. H., Nieuwland, J. A. Condensation of Alkyl Acetylenes with Oxy Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *56*, 1130-1132.
184. Nieuwland, J. A., Vogt, R. R., and Foohey, W. L. A New Method of Preparing Acetals. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 1018-1024.
185. Clinet, J. C., Linstrumelle, G. A New simple stereoselective synthesis of trans- $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1137-1140.
186. Para procesos de hidrólisis de derivados *bis*(etnil)mercúricos relacionados, ver: a) Bassetti, M., Floris, B., Illuminati G. The reaction of ethynyl ferrocene with mercuric acetate. *Organometallics* **1985**, *4*, 617-623. b) Camps M., Montheard J. P., Benzaid, A. Acetodemercuration of bis(phenylethynyl)mercury in acetic acid and its relation to catalysis of acetic acid addition to phenylacetylene. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1989**, 123-129.
187. Budde, W. L., and Dessy, R. E. The Homogeneously Catalyzed Hydration of Acetylenes by Mercuric Perchlorate-Perchloric Acid: Evidence for a Bis-(acetylene)-Mercuric Ion Complex as an intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3964-3970.
188. Liu, L., Wong, W. Y., Lam, Y. W., Tam, W. Y., Exploring a series of monoethynylfluorenes as alkynylating reagents for mercuric ion: Synthesis, spectroscopy, photophysics and potencial use in mercury speciation. *Inorg. Chim. Acta.* **2007**, *360*, 109-121.
189. Dewar, M. J. S., and Merz, K. M. Jr. Aspects of Organomercury Chemistry. *Organometallics* **1985**, *4*, 1967-1972.
-

- 
190. Rodríguez, F., Rozas, I., Kaiser, M., Brun, R., Nguyen, B., Wilson, W. D., García, R. N., Dardonville, C. New Bis(2-aminoimidazoline) and Bisguanidine DNA Minor Groove Binders with Potent in Vivo Antitrypanosomal and Antiplasmodial Activity. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 909-923.
191. López, M., Coca, J., Sastre, H. Anion Exchange in Amberlite IRA-400 and Amberlite IRA-410 Ion Exchange Resins. *J. Chem. Eng. Data* **1992**, *37*, 274-277.
192. Cao, X., Yun, H. S., Koo, Y. M. Recovery of L-(+)-Lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. *Biochem. Eng. J.* **2002**, *11*, 189-196.
193. Chabani, M., Amrane, A., Bensmaili, A. Kinetics of nitrates adsorption on Amberlite IRA 400 resin. *Desalination* **2007**, *206*, 560-567.
194. Lin, Y. M., Helquist, P., Miller, M. J. Synthesis and Biological Evaluation of a Siderophore-Virginiamycin Conjugate. *Synthesis* **1999**, 1510-1514.
195. Cañadas, O., Sáenz, A., Orellana, G., Casals, C. Equilibrium studies of a fluorescent tacrolimus binding to surfactant protein A. *Anal. Biochem.* **2005**, *340*, 57-65.
196. Giambattista, M. D., Nyssen, E., Pecher, A., Cocito, C. Affinity Labeling of the Virginiamycin S Binding Site on Bacterial Ribosome. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9203-9211.
197. Nilsson, A. M., Berström, M. A., Luthman, K., Nilsson, J. L. G., Karlberg, A. T. An  $\alpha,\beta$ -unsaturated oxime identified as a strong contact allergen Indications of antigen formation via several pathways. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1627-1636.
198. Petersen, J. S., Fels, G., and Rapoport, H. Chirospecific Syntheses of (+)- and (-)-Anatoxin-a. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4539-4541.
199. Wiseman, J. R., and Lee, S. Y. Synthesis of Anatoxin-a. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2485-2487.
200. Tomita, T., Kita, Y., Kitamura, T., Sato, Y., Mori, M. Further studies on enantioselective synthesis of (+)-anatoxin-a using enine metathesis: unexpected inversion of chirality via a skeletal rearrangement of 9-azabicyclo[4.2.1]nonene derivative. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10518-10527.
201. Lagone, J., Vunaski, V. Radioimmunoassay of Nicotine, Cotine, and Gamma-(3-Pyridyl)-Gamma-Oxo-N-Methylbutyramide. *Methods Enzymol.* **1982**, *84*, 628-640.
202. Nakajima, N., Ikada, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 123-130.
203. Desai, M. C., Stramiello Stephens, L. M. Polymer bond EDC(P-EDC): A convenient reagent for formation of an amide bond. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7685-7688.
204. Ogura, H., Kobayashi, T., Shimizu, K., Kawabe, K., Takeda, K. A Novel Active Ester Synthesis Reagent (N,N'-Disuccinimidyl Carbonate). *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4745-4746.
205. Patent U.S. 0122788 A1, 17 mayo, 2012.
206. Matsushita, M., Hoffman, T. Z., Ashley, H. J., Zhou, B., Wirsching, P., and Janda, K. Cocaine Catalytic Antibodies: The Primary Importance of Linker Effects. *Bioorg. Med. Lett.* **2001**, *11*, 87-90.
207. Esteve-Turrillas, F. A., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. Mepanipyrim haptens and antibodies with nanomolar affinity. *Analyst*, **2013**, *138*, 3360-3364.
-

- 
208. Shoyama, Y., Fukada, T., Tanaka, T., Kusai, A., and Nojima, K. Direct Determination of Opium Alkaloid-Bovine Serum Albumin Conjugate by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 1051–1053.
209. White, J. F., Holladay, J. E., Zacher, A. A., Frye, J. G. Jr., Werpy, T. A. Challenges in Catalytic Manufacture of Renewable Pyrrolidones from Fermentation Derived Succinate. *Top. Cat.* **2014**, *57*, 1325–1334.
210. Lee, H., Hwang, S. J., Jung, J., Hong, S., Lee, M., Park, H., Lee, H.-J., Park, Y. Asymmetric synthesis and evaluation of  $\alpha$ -quaternary chiral lactam derivatives as novel anticancer agents. *Arch. Pharm. Res.* **2014**, *37*, 1264–1270.
211. Kumari, M., Maurya, J. K., Singh, U. K., Khan, A. B., Ali, M., Singh, P., Patel, R. Spectroscopic and docking studies on the interaction between pyrrolidinium based ionic liquid and bovine serum albumin. *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *124*, 349–356.
212. Yanagisawa, H., Ishihara, S., Ando, A., Kanazaki, T., Miyamoto, S., Koike, H., Iijima, I. Y., Oizumi, K., Matsushita, Y., Hata, T. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. 2. Perhydroazepin-2-one derivatives. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 422–428.
213. Shimizu, K., and Akiyama, M. Synthesis of linear and cyclic trihydroxamic acids as models for ferrioxamines E and G. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1985**, 183–184.
214. Singh, K., V., Kaur, J., Varshney, G. C., Raje, M., Suri, C. R. Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 168–173.
215. Skrinjar, M., Nilsson, C., Wistrand, L. G. An efficient synthesis of (+)-anatoxin-a. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1992**, *3*, 1263–1270.
216. Newcombe, N. J., Simpkins, N. S. A Concise Asymmetric Synthesis of (-)-Anatoxin-a using an Enantioselective Enolisation Strategy. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 831–832.
217. Campbell, H. F., Edwards, O. E., Kolt, R. Synthesis of nor-anatoxin-a and anatoxin-a. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 1372–1379.
218. Riva, R., Banfi, L., Basso, A., Zito, P. A new diversity oriented and metal-free approach to highly functionalized 3H-pyrimidin-4-ones. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2107–2122.
219. Pescatore, G., Kinzel, O., Atteni, B., Cecchetti, O. Optimization of a series of potent and selective ketone histone decetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5528–5532.
220. Nigeri, R., Shinde, A., Daulatabad, A. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Piperidin-4-yl amino aryl sulfonamides: Novel, Potent, Selective, Orally Active, and Brain Penetrant 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9255–9269.
221. Tanner, D. and Somfai, P. A mild efficient method for the preparation of N-tosyl amides and lactams. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 613–18.
222. Zareef, M., Iqbal, R., Khan, K. M., Zaidi, J. H., Arfan, M.A convenient synthesis of *p*-substituted 1-arylsulfonyl-pyrrolidin-2-ones. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23*, 485–488.
223. Boal, W. B., Schammell, A. W., Garg, N. K. An Interrupted Fisher Indolization Approach toward Fused Indoline-Containing Natural Products. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3458–3461.
224. Mercader, J. V., Suárez-Pantaleón, C., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. Hapten Synthesis and Monoclonal Antibody-Based Immunoassay Development for the Detection of the Fungicide Kresoxim-methyl. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1545–1552.
-

225. Mercader, J. V., Suarez-Pantaléon, C., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to the Strobilurin Pesticide Pyraclostrobin. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7682-7690.
226. Esteve-Turrillas, F., Parra, J., Abad-Fuentes, A, Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Mercader, J. V. Hapten Synthesis, Monoclonal Antibody Generation, and Development of Competitive Immunoassays for the Analysis of Picoxystrobin in Beer. *Anal.Chim. Acta* **2010**, *682*, 93-103.
227. Armarego, W. L., Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*, 4<sup>th</sup> Ed. Armarego, W. L., Perrin, D. D., Eds. Butterworth Heinemann Press: Oxford, **1996**.
228. Wright, S. W., Hageman, D. L., Wright, A. S., Lester D. McClure, L. D. Convenient Preparations of *t*-Butyl Esters and Ethers from *t*-Butanol. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7345-7348.
229. [http://www.nr-cnrc.gc.ca/eng/solutions/advisory/crm/biotoxin/list\\_products.html](http://www.nr-cnrc.gc.ca/eng/solutions/advisory/crm/biotoxin/list_products.html) (consulta, Julio 2015).
230. Kanne, D. B., Ashworth, D. J., Cheng, M. T., and Mutter, L. C. Synthesis of the First Highly Potent Bridged Nicotinoid. 9-azabicyclo[4.2.1]nona[2,3-*c*]pyridine(Pyrido[3,4-*b*]homotropane). *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7864-7865.
231. Vianello, P., Albinati, A., Pinna, G. A., Levecchia, A., Marinelli, L., Borea, P. A., Gessi, S., Fadda, P., Tronci, S., Cignarella, G. Synthesis, Molecular Modeling, and Opioid Receptor Affinity of 9,10-Diazatryciclo[4.2.1.1<sup>2,5</sup>]decanes and 2,7-Diazatryciclo[4.4.0.0<sup>3,8</sup>]decanes Structurally related to 3,8-Diazabicyclo[3.2.1]octanes. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2115-2123.
232. Sakamoto, T., Cullen, M.D., Hartman, T. L. Synthesis and Anti-HIV activity of new Metabolically Stable Alkenyldiarylmethane Non-Nucleosid Reverse Transcriptase Inhibitors Incorporating N-Methoxy Imidoyl Halid and 1,2,4-Oxadiazole Systems. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3314-3321.
233. Howard, M. H., Sardina, F. J., Rapoport, H. Chirospecific Syntheses of Nitrogen and Side-Chain Modified Anatoxin Analogues. Synthesis of (1*R*)-Anatoxinal and (1*R*)-Anatoxic Acid Derivatives. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2829-2838.
234. Danheiser, R. L., Morin, J. M. Jr., and Salaski, E. J. Efficient Total Synthesis of (±)-Anatoxin *a*. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8066-8073.
235. Riva, R., Banfi, L., Basso, A., and Zito, P. A New diversity oriented and Metal-Free approach to highly functionalized 3*H*-pyrimidin-4-ones. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2107-2122.
236. Chen, T. Y., Tsutsumi, R., Montgomery, T. P., Volchkov, I., and Krische, M. J. Ruthenium-Catalyzed C-C Coupling of Amino Alcohols with Dienes via Transfer Hydrogenation: Redox-Triggered Imine addition and Related Hydroaminoalkylations. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1798-1801.
237. Kuethe, J. T., Marcoux, J. F., Wong, A., Wu, J., Hillier, M. C., Dormer, I. W., and Hughes, D. L. Stereoselective-Based NK1 Receptor Antagonist Bearing an Unsymmetrically substituted sec-sec ether. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7378-7390.
238. Nowinski, R., C., Lonstrom, M. E., Tam, M. R., Stone, M. R., Burnette, W. N. Isolation of Hybrid Cell-Lines Producing Monoclonal Antibodies against the P15(E) Protein of Ecotropic Murine Leukemia Viruses. *Virology* **1979**, *93*, 111-126.

239. Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B., Rajewsky, K. New Mouse Myeloma Cell-Line That Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody-Secreting hybrid Cell Lines. *J. Immunol.* **1979**, *123*, 1548-1550.
240. Montoya, A., Castell, J. V. Long-Term Storage of Peroxidase-Labeled Immunoglobulins for Use in Enzyme-Immunoassay. *J. Immunol. Methods* **1987**, *99*, 13-20.
241. Rodbard, D. Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radio immunoassays and Immunoradiometric Assays. *Clin. Chem.* **1974**, *20*, 1255-1270.

## ANEXOS

 Datos espectroscópicos de RMN de anatoxina-a

**Tabla 7.1** Datos de RMN  $^1\text{H}$  para (+)-anatoxina-a<sup>a</sup>

protón	$\delta$ (ppm)		Multiplicidad	$\Delta\delta^b$ (ppm)
	Anatoxina-a como base libre en $\text{CDCl}_3$	Anatoxina-a como sal del $\text{HCl}$ en $\text{D}_2\text{O}$		
H-1	4.72	5.02	ddd	-0.30
H-3	6.91	7.48	ddd	-0.57
H-4 $\alpha$	2.45	2.63	dddd	-0.18
H-4 $\beta$	2.52	2.71	dddd	-0.19
H-5 $\alpha$	1.72	1.92	dddd	-0.20
H-5 $\beta$	1.85	2.11	dddd	-0.26
H-6	3.85	4.30	dddd	-0.45
H-7 $\alpha$	1.75	1.95	dddd	-0.20
H-7 $\beta$	2.03	2.24	dddd	-0.21
H-8 $\alpha$	1.66	2.02	dddd	-0.36
H-8 $\beta$	2.21	2.43	dddd	-0.22
-CH <sub>3</sub>	2.29	2.37	s	-0.08

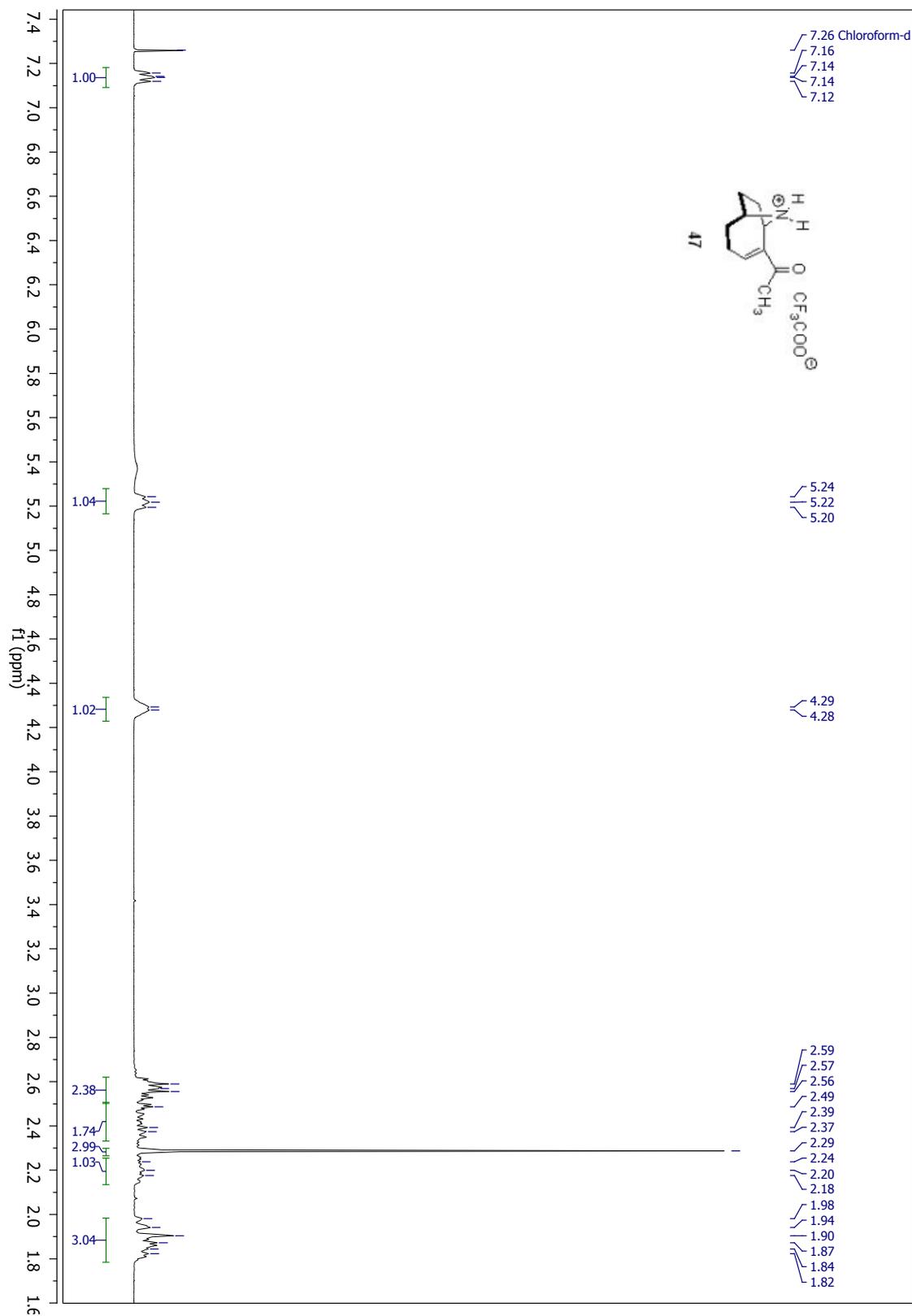
  

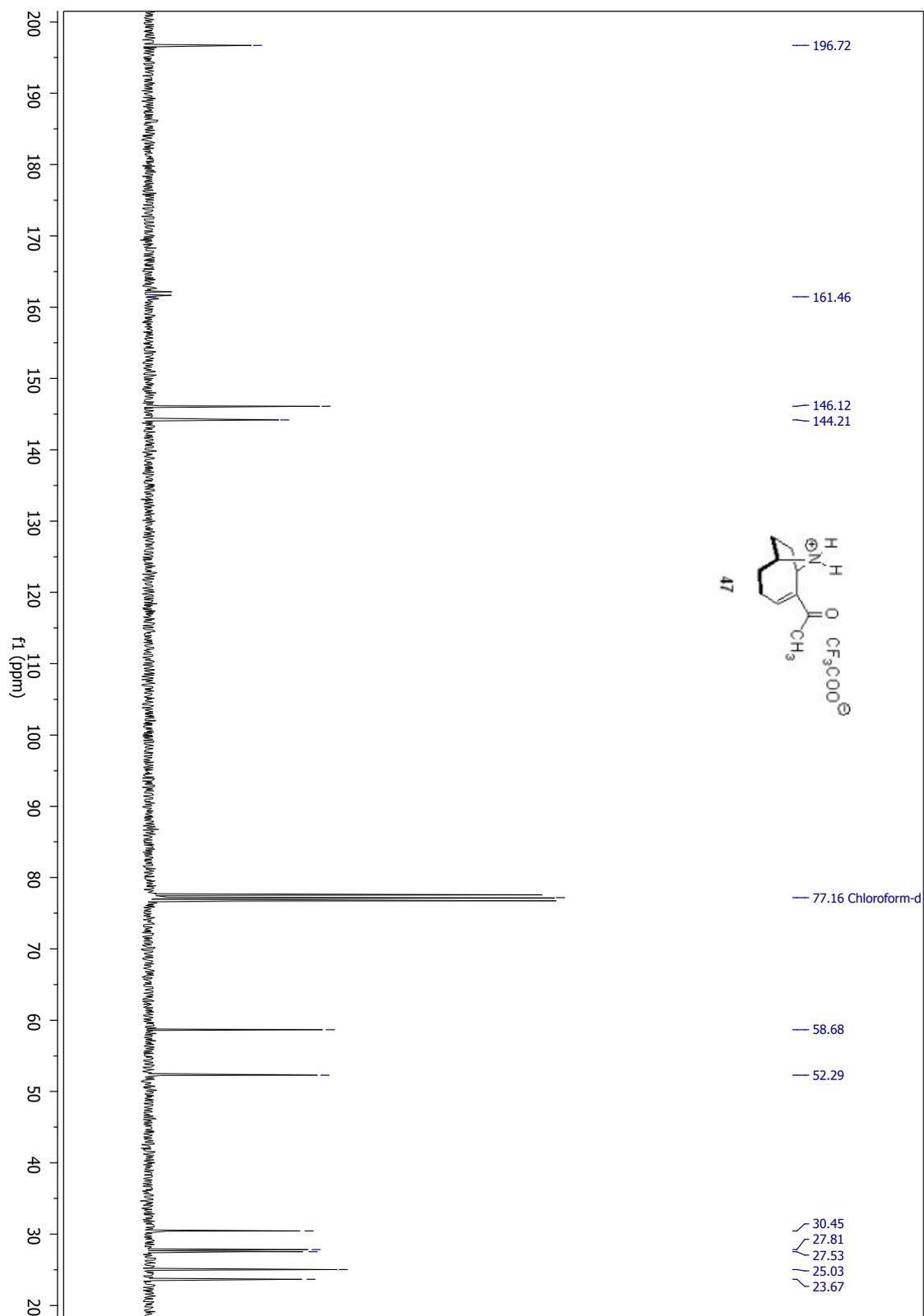
Acoplamientos ( $J$ )(Hz)					
$J_{1,3}$	1.5	$J_{4\beta,5\alpha}$	5	$J_{7\alpha,8\alpha}$	9.5
$J_{1,8\alpha}$	2	$J_{4\beta,5\beta}$	5	$J_{7\alpha,8\beta}$	4
$J_{1,8\beta}$	9	$J_{5\alpha,5\beta}$	14.5	$J_{7\beta,8\alpha}$	6
$J_{3,4\alpha}$	4	$J_{5\alpha,6}$	2	$J_{7\beta,8\beta}$	12.5
$J_{3,4\beta}$	7.5	$J_{5\beta,6}$	3.5	$J_{8\alpha,8\beta}$	12.5
$J_{4\alpha,4\beta}$	17.5	$J_{6,7\alpha}$	3.5		
$J_{4\alpha,5\alpha}$	4.5	$J_{6,7\beta}$	7.5		
$J_{4\alpha,5\beta}$	11	$J_{7\alpha,7\beta}$	12.5		

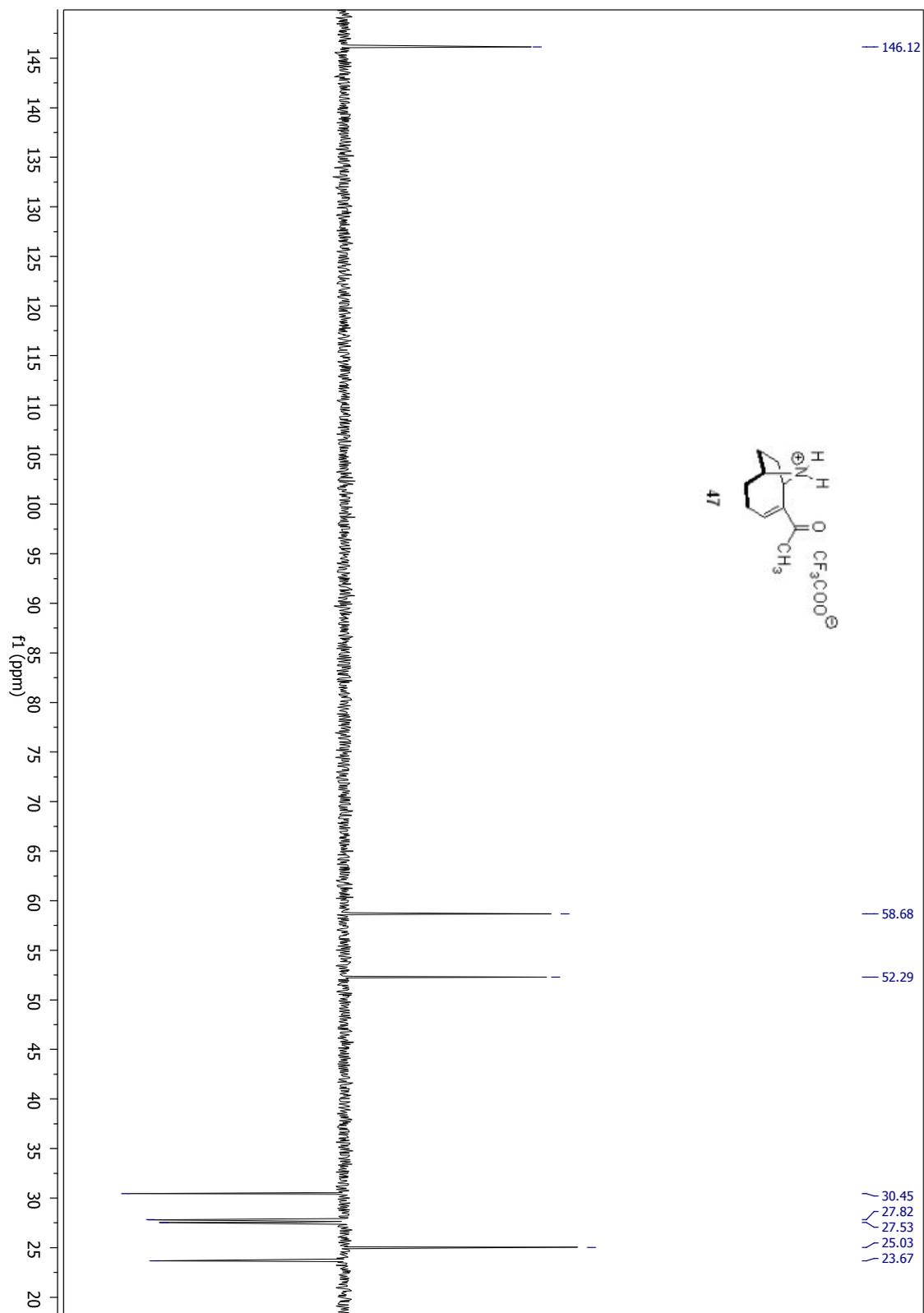
<sup>a</sup> Adaptada de Koskinen y cols., 1985 (referencia 37)

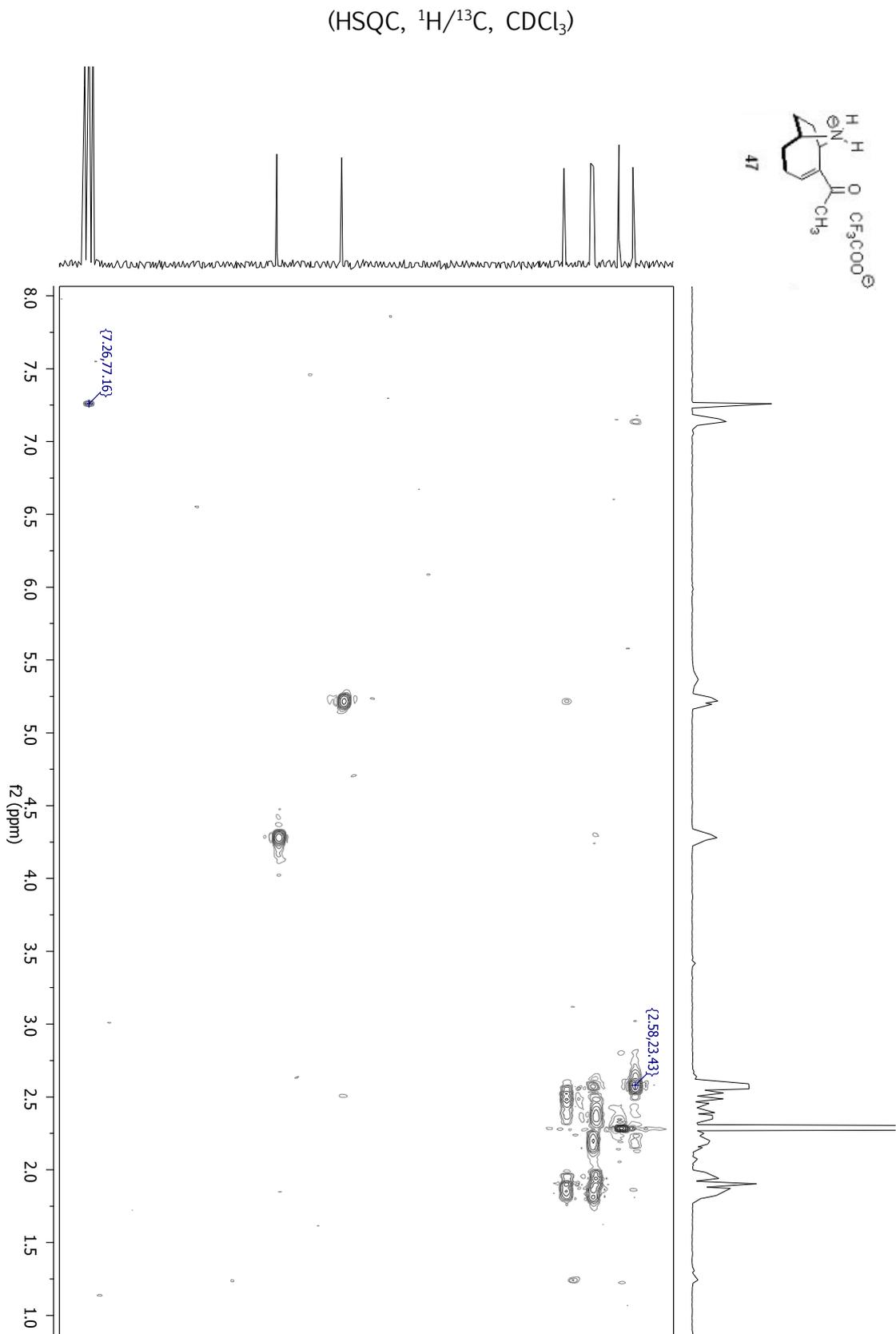
<sup>b</sup>  $\Delta\delta = \delta(\text{anatoxina base libre}/\text{CDCl}_3) - \delta(\text{anatoxina-a-HCl}/\text{D}_2\text{O})$ .  $\Delta\delta < 0$  significancias de desplazamientos a campo bajo.

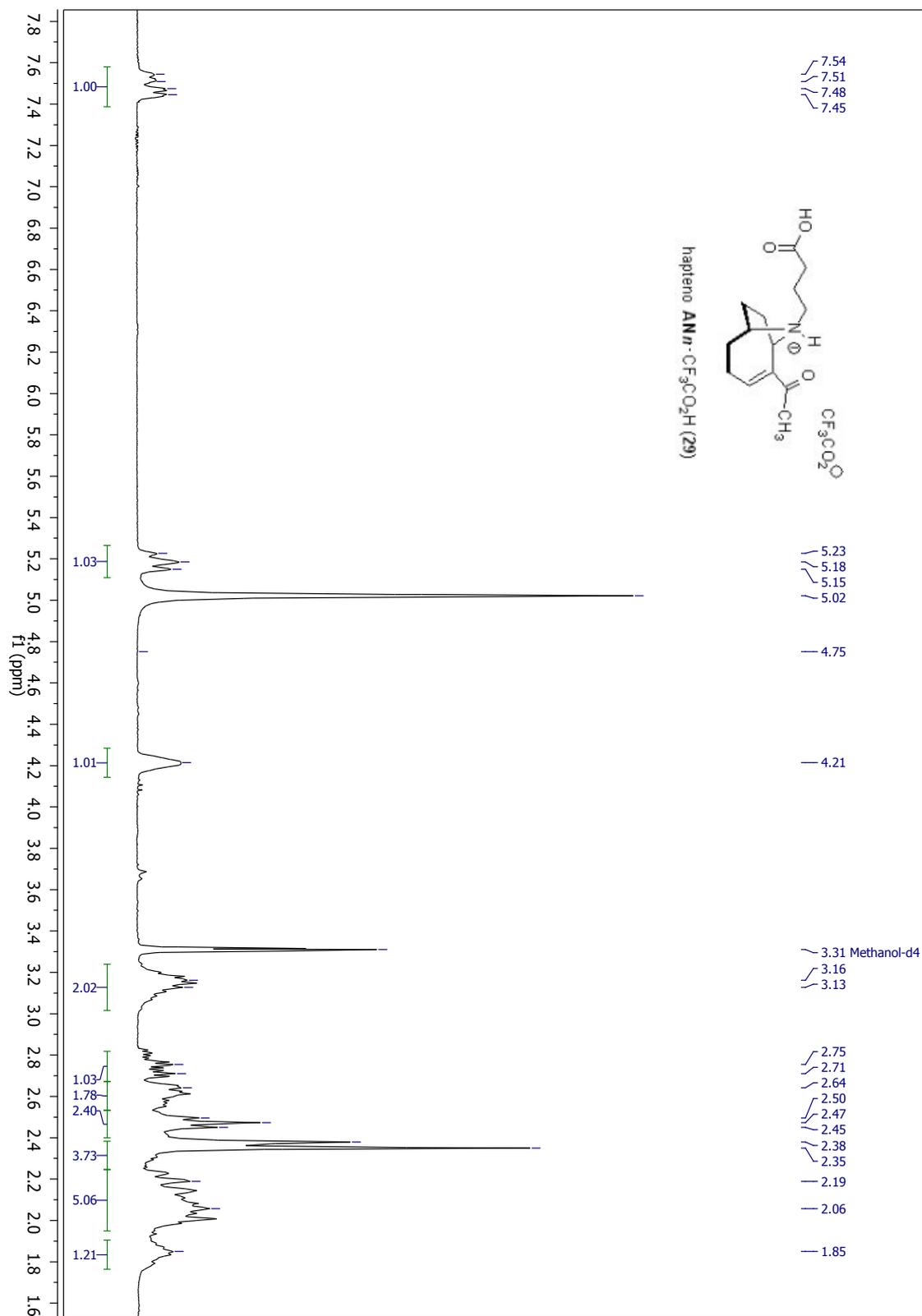
## Selección de espectros de RMN

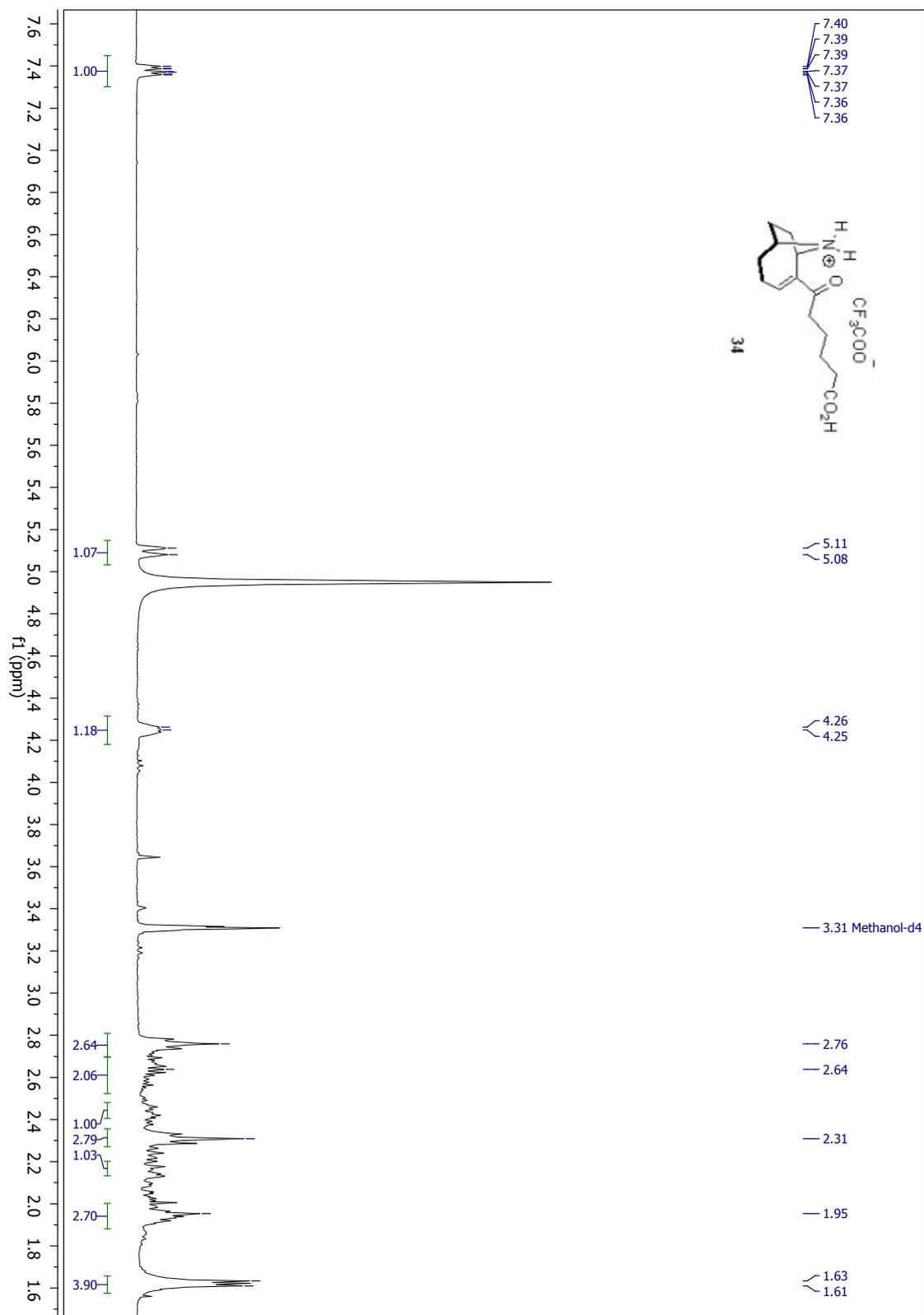
 $(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

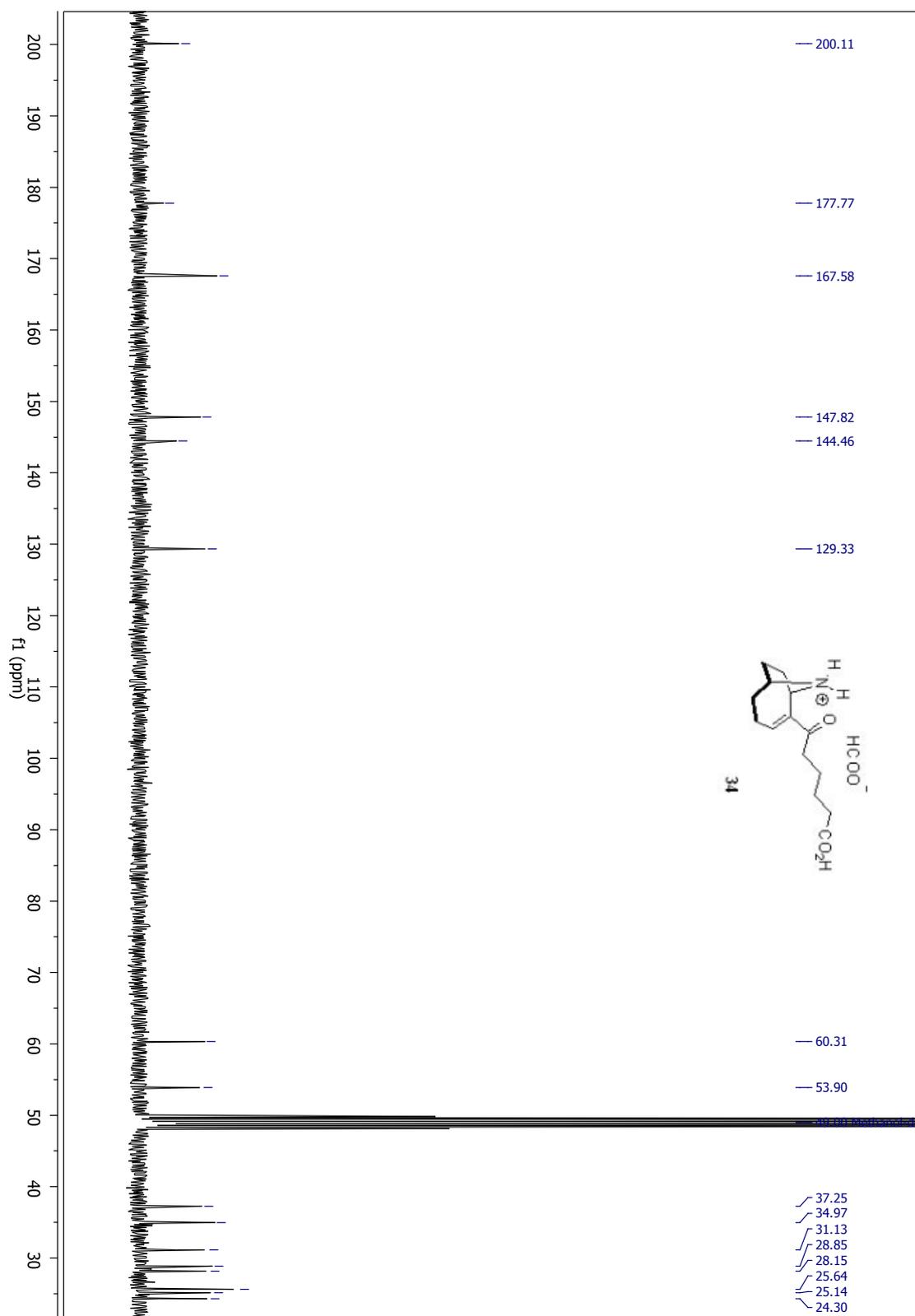
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

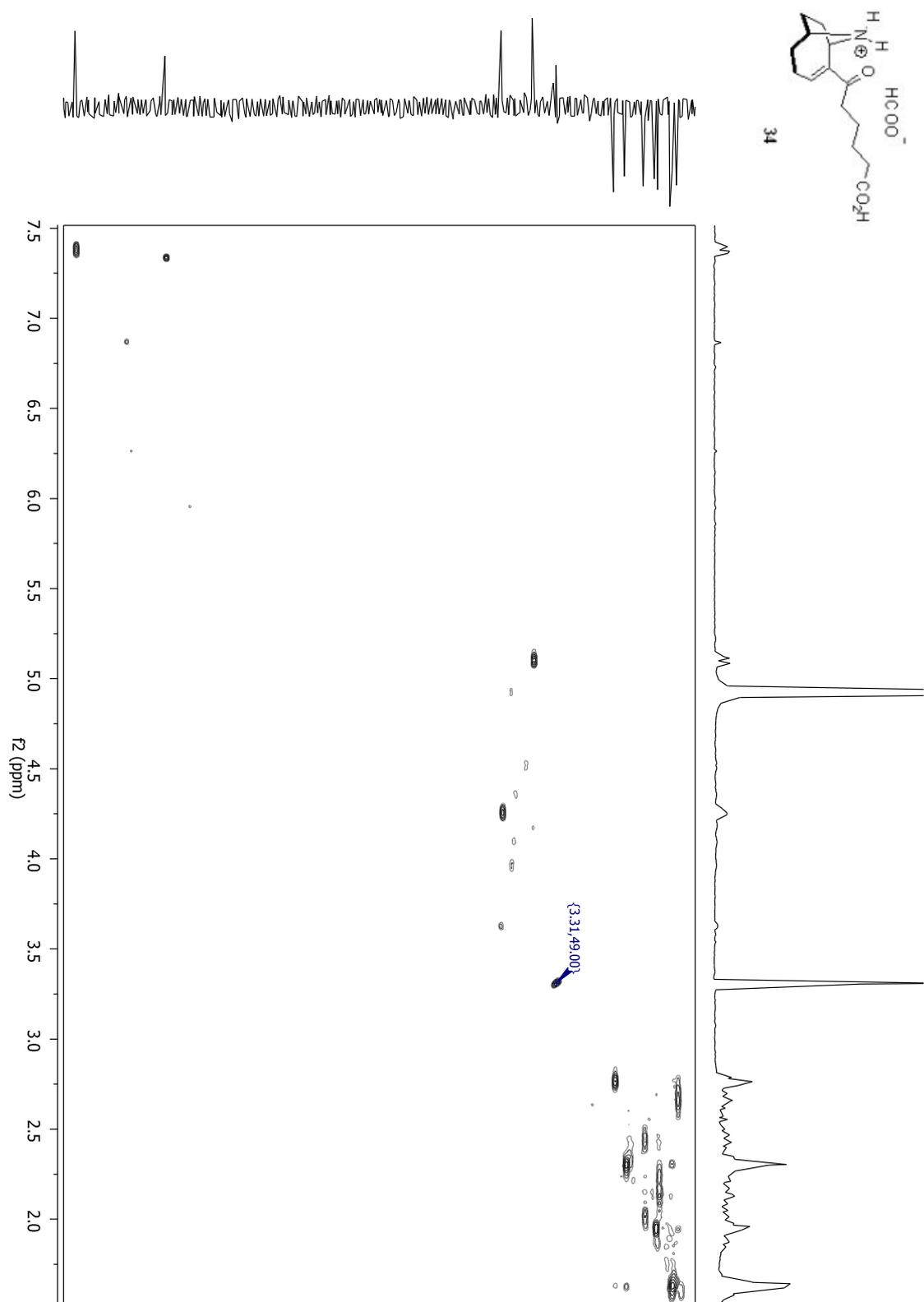
(DEPT, 75 MHz CDCl<sub>3</sub>)

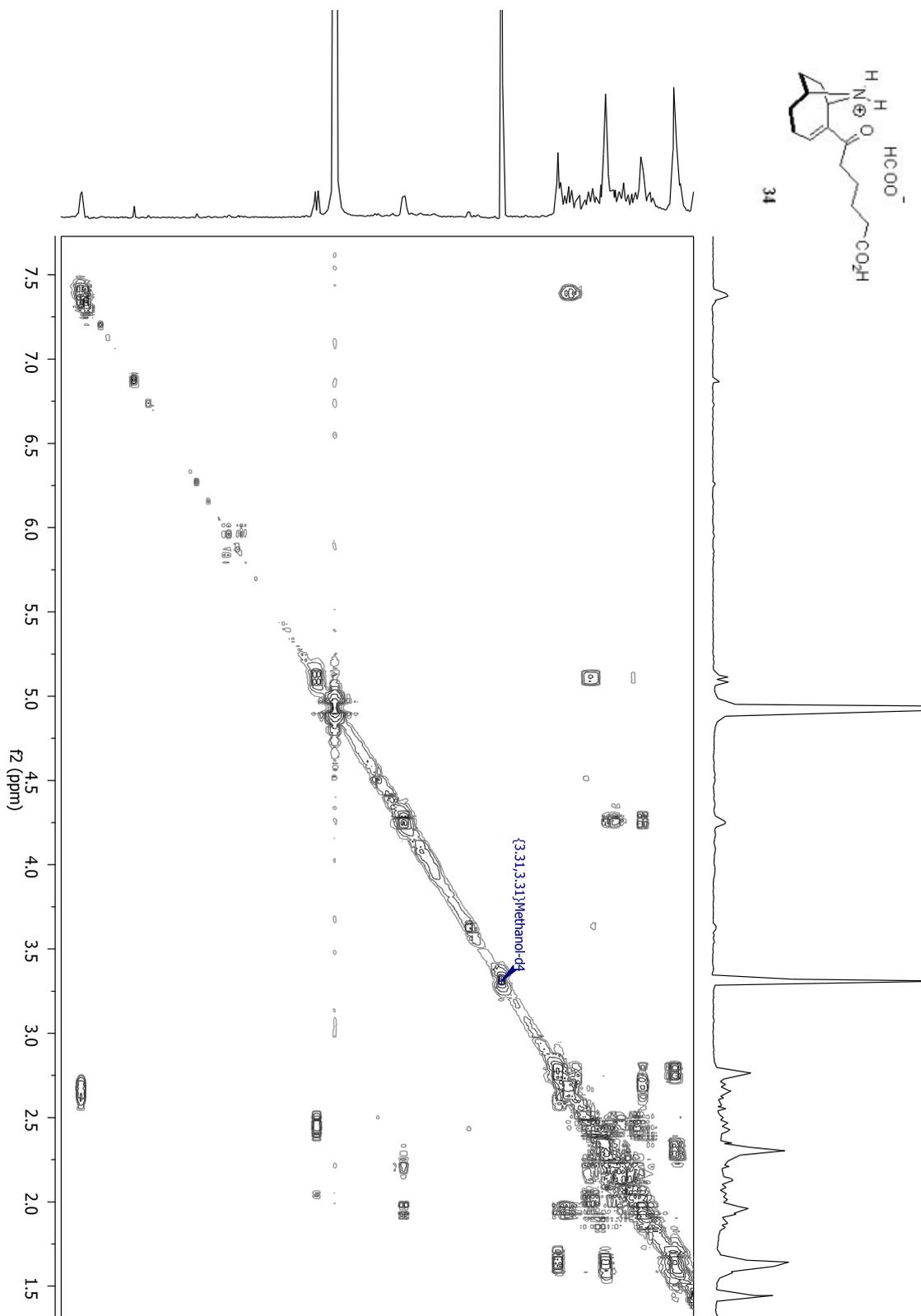


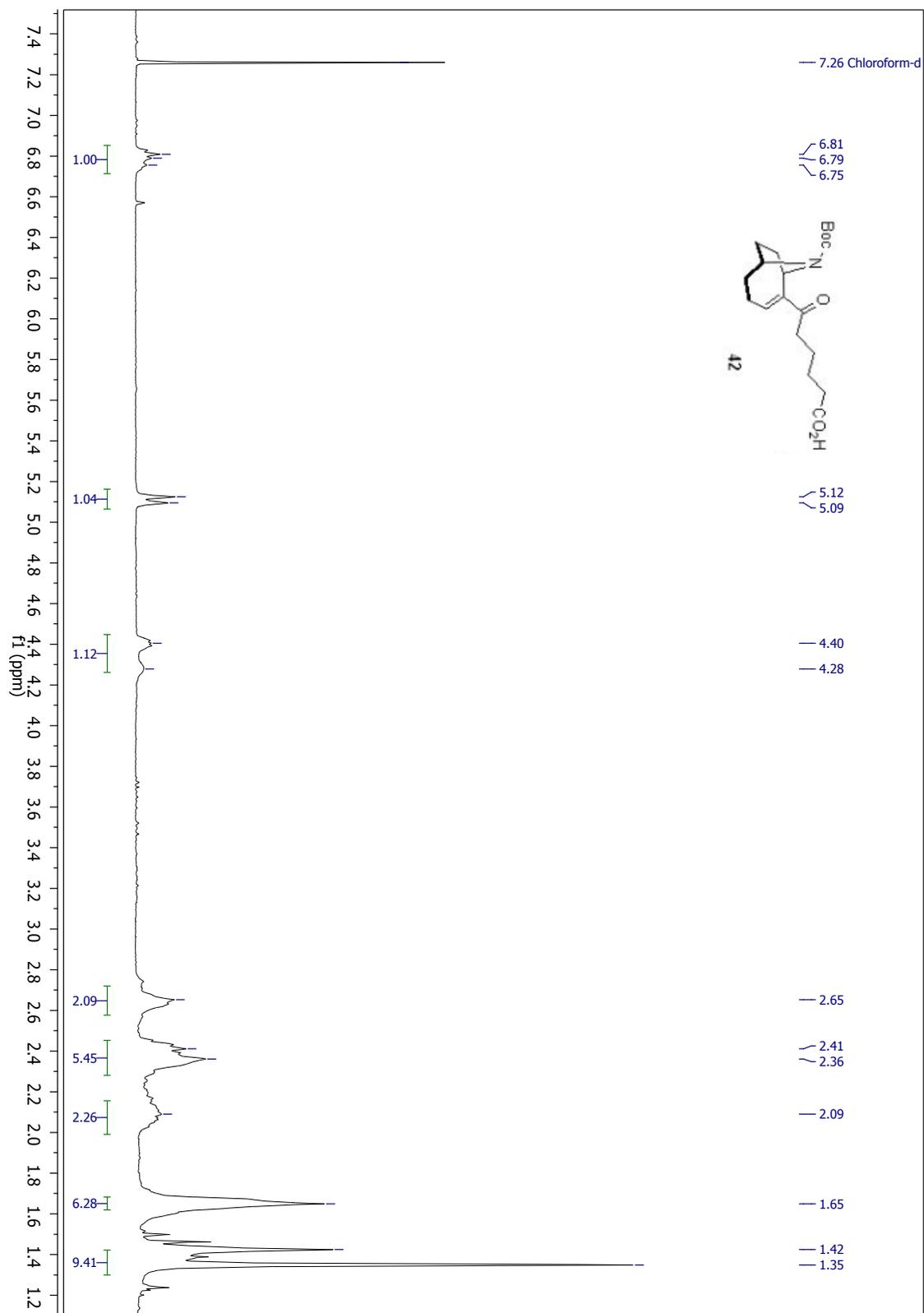
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz, MeOD

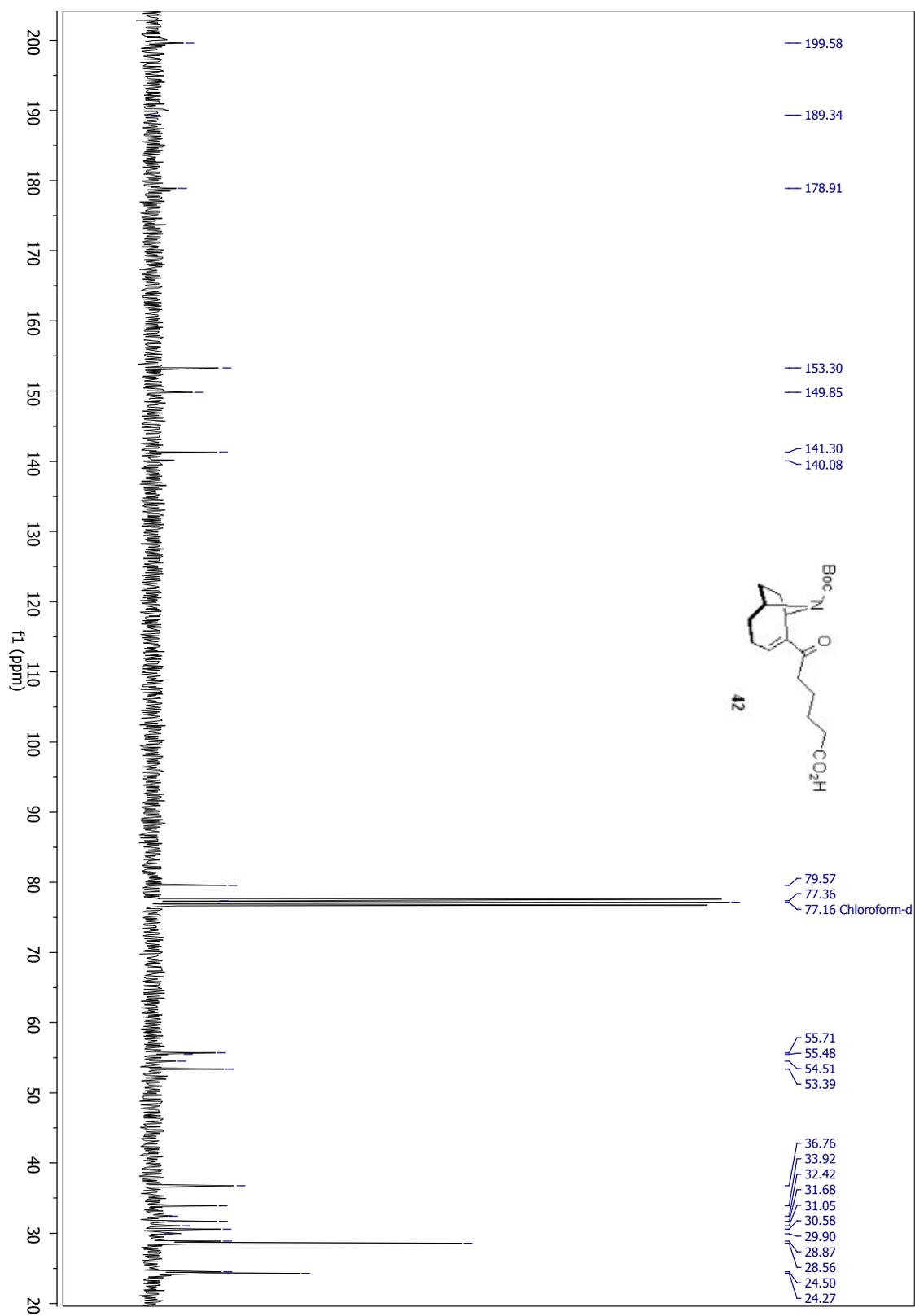
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz, MeOD

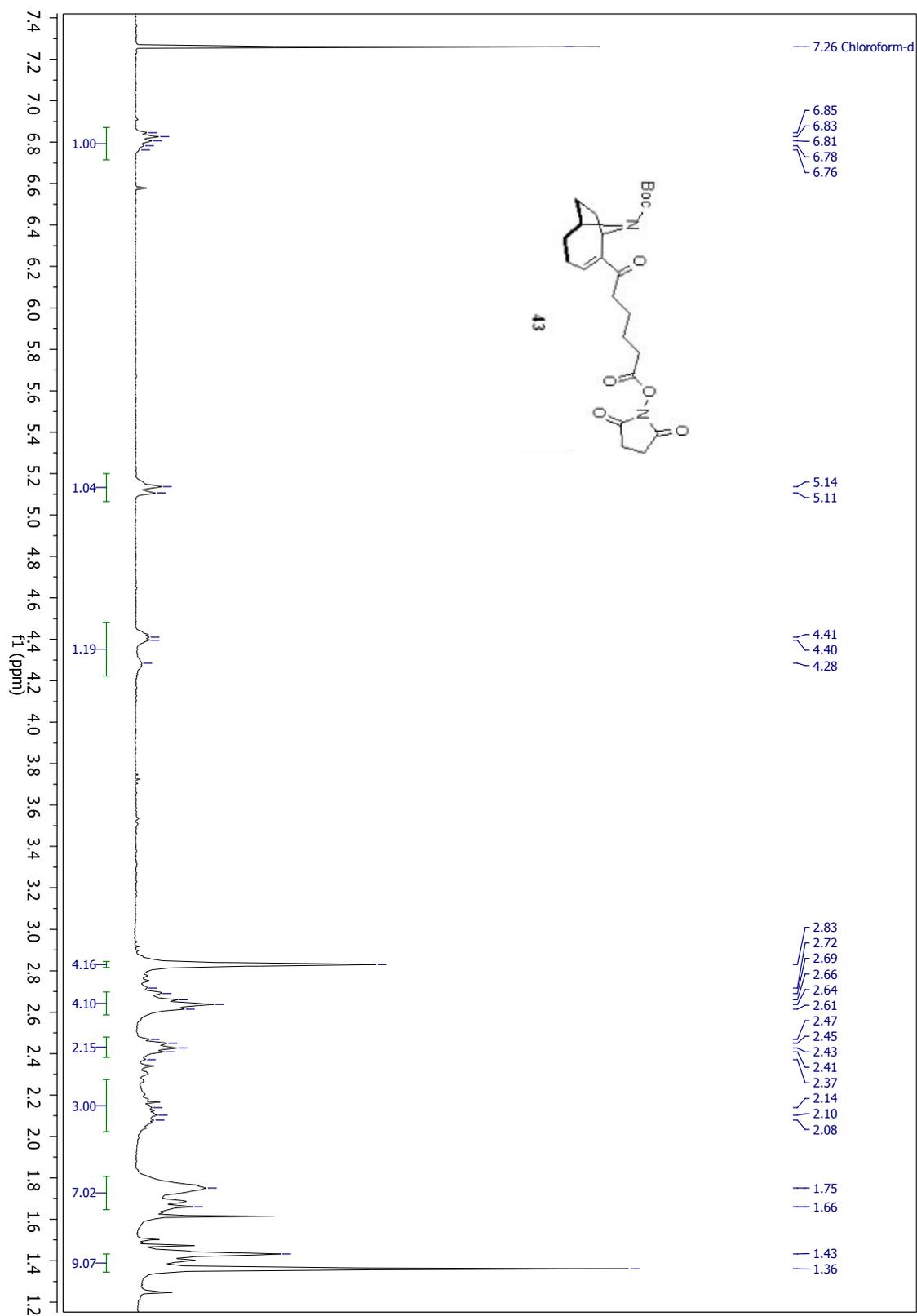
$(^{13}\text{C}\text{-RMN}, 75 \text{ MHz, MeOD})$ 

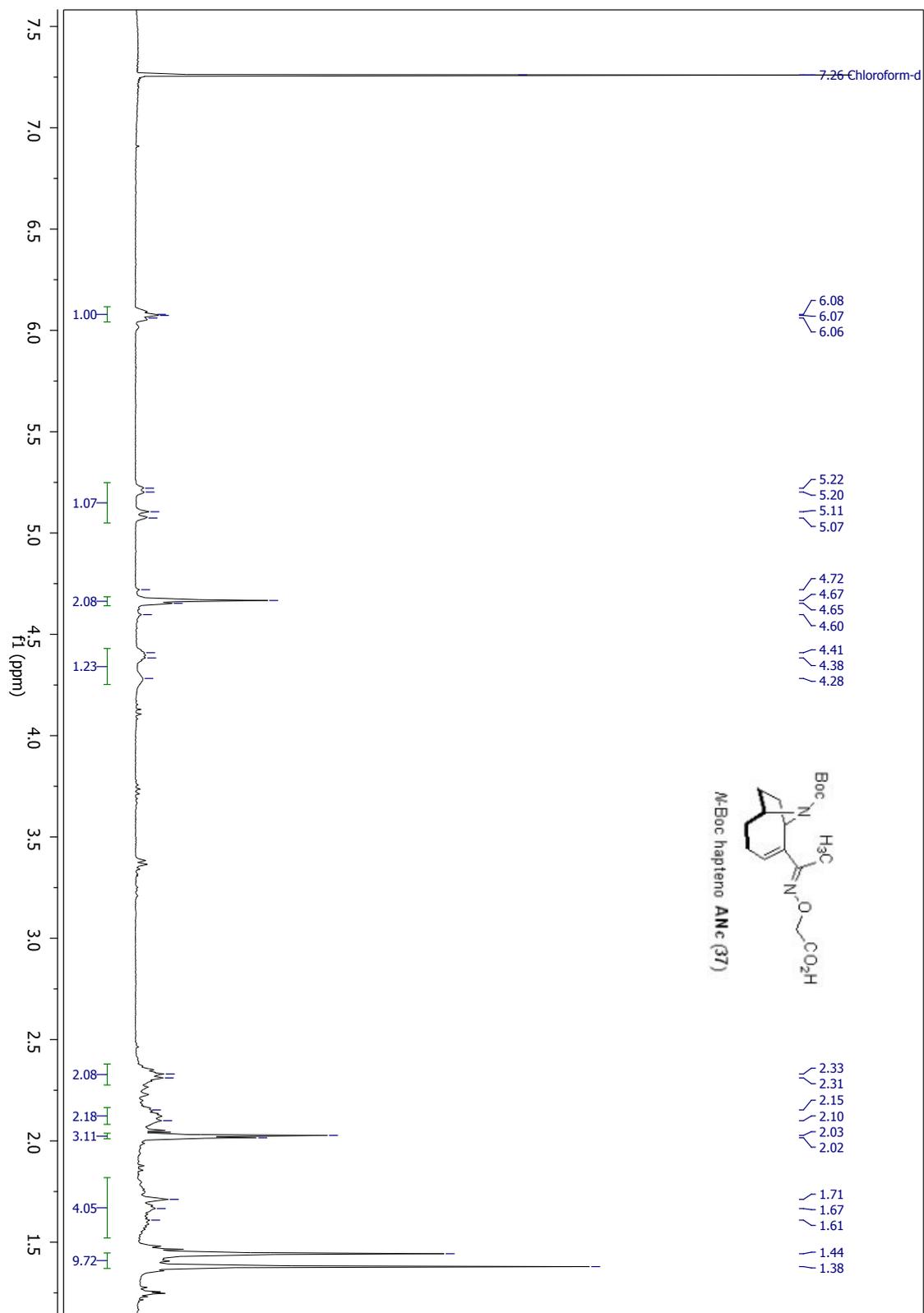
(HSQC,  $^1\text{H}/\text{DEPT}$ , MeOD)

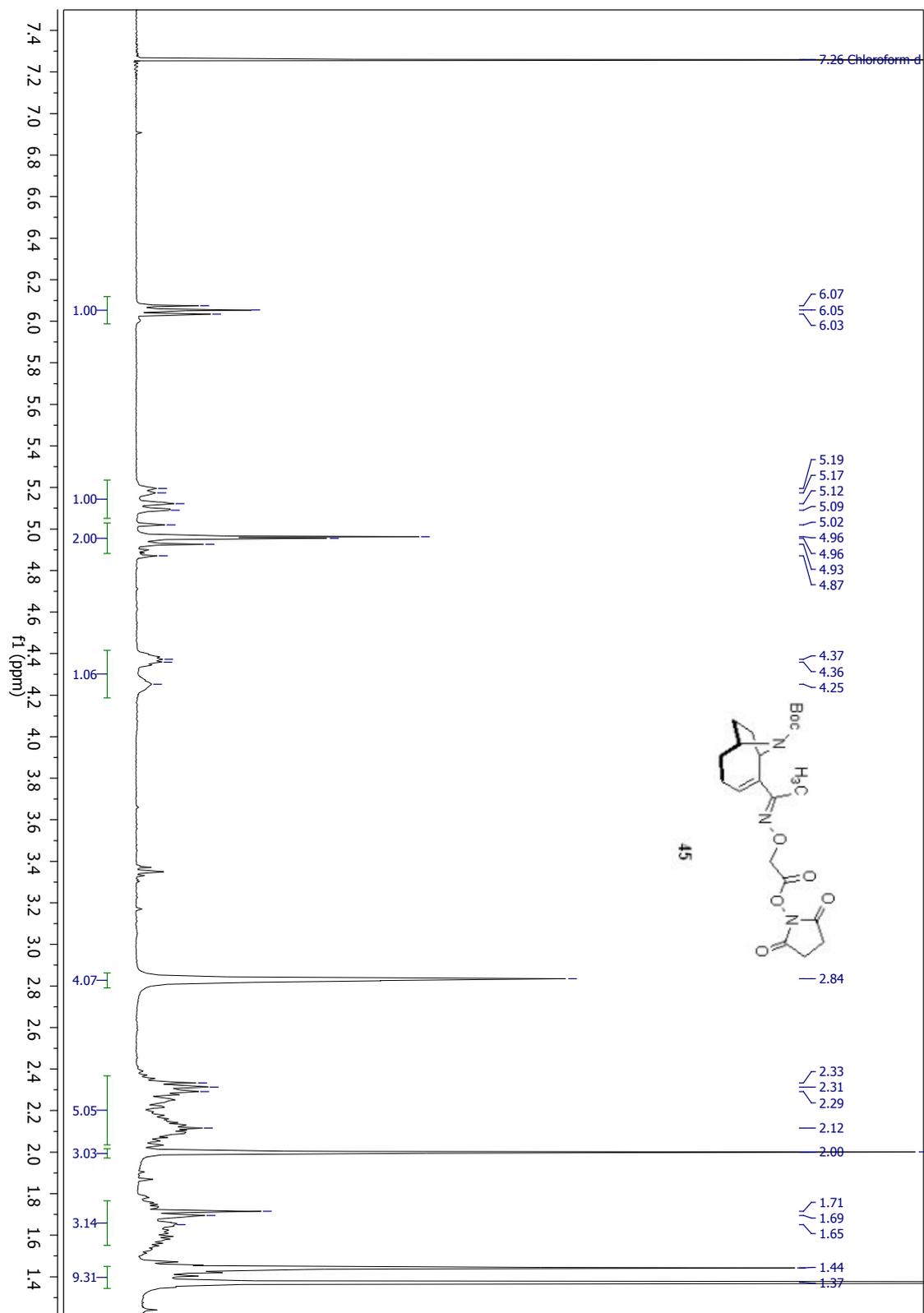
(COSY, 300 MHz CDCl<sub>3</sub>)

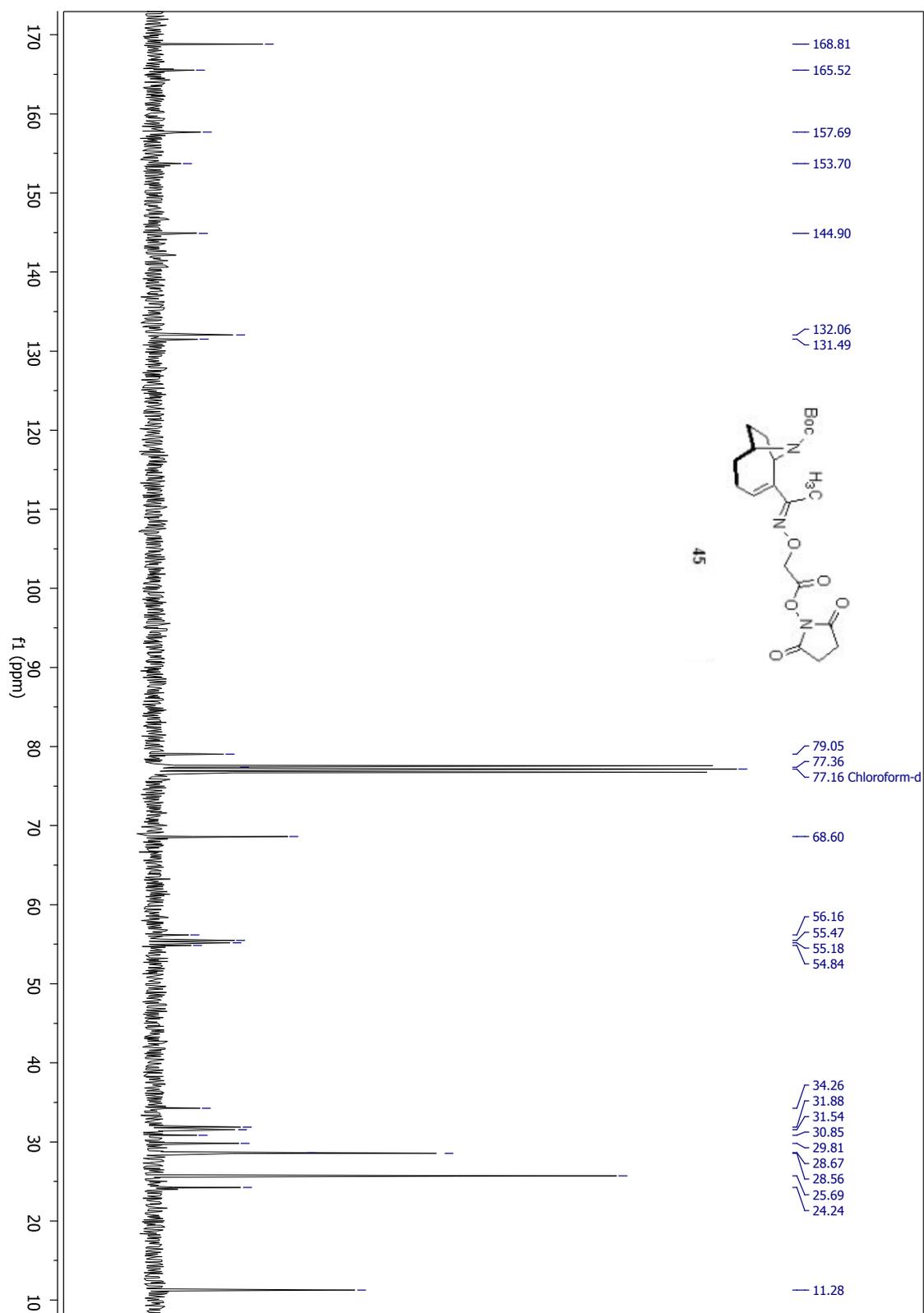
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

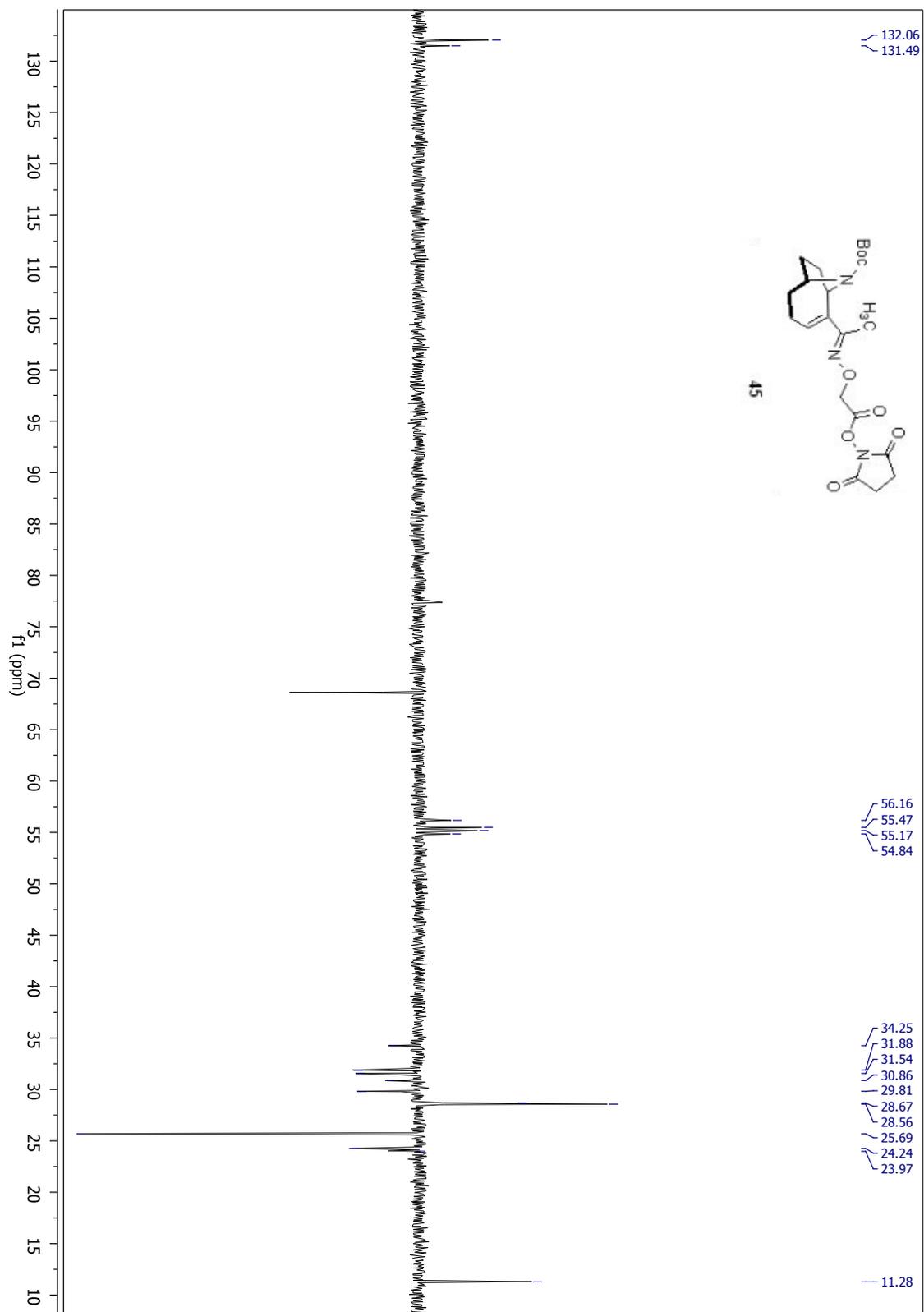
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

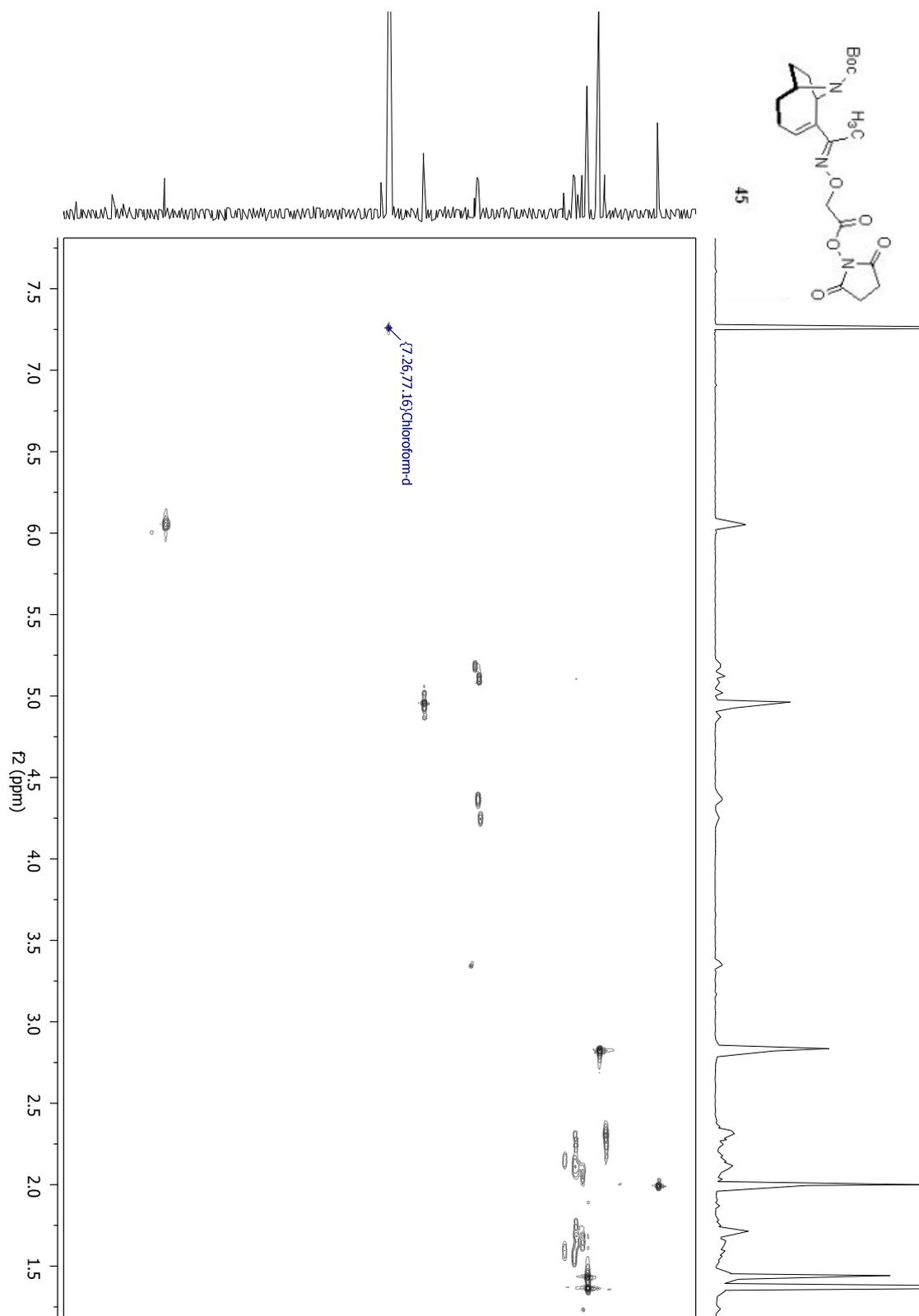
$(^1\text{H-RMN}, 300 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

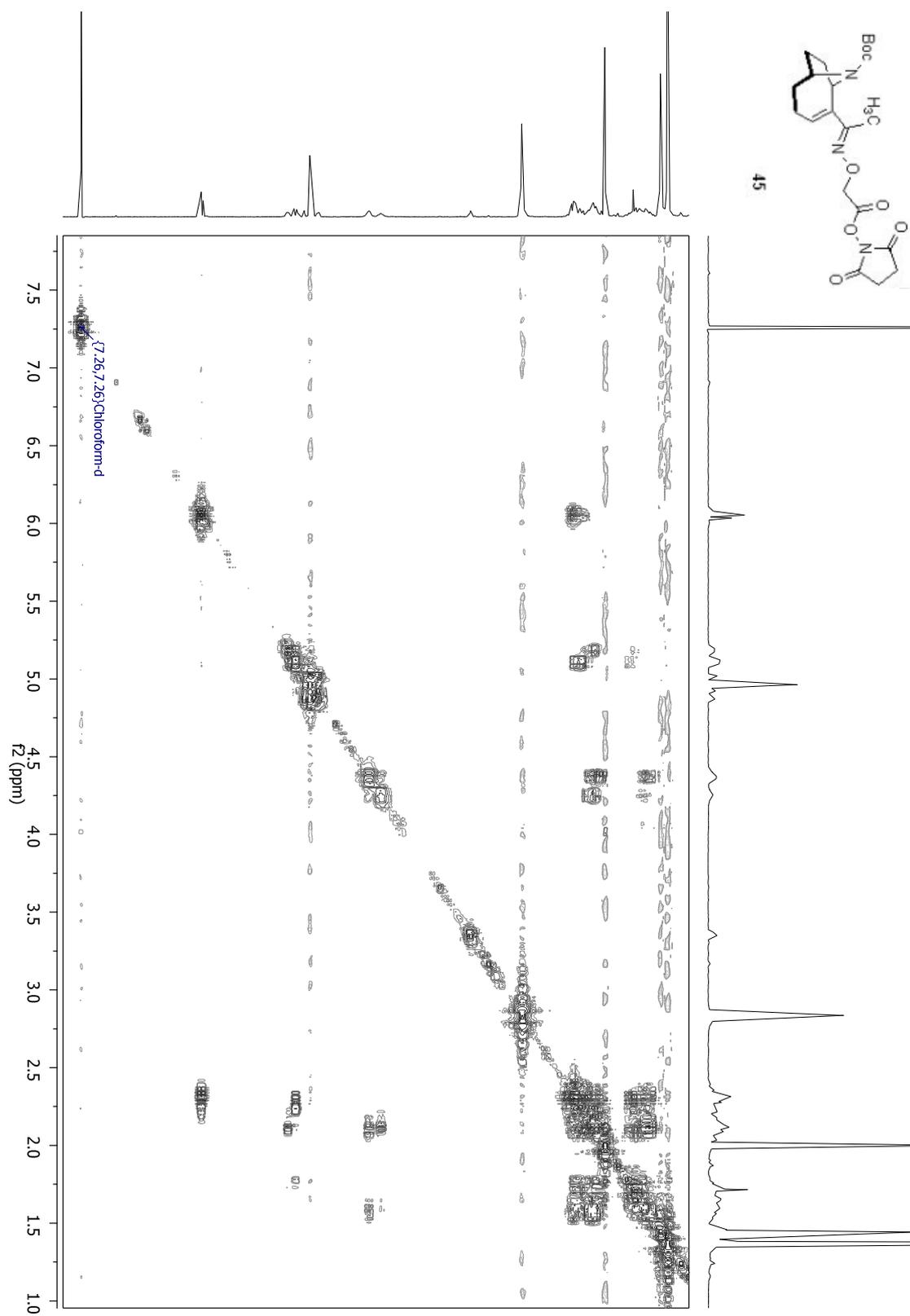
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

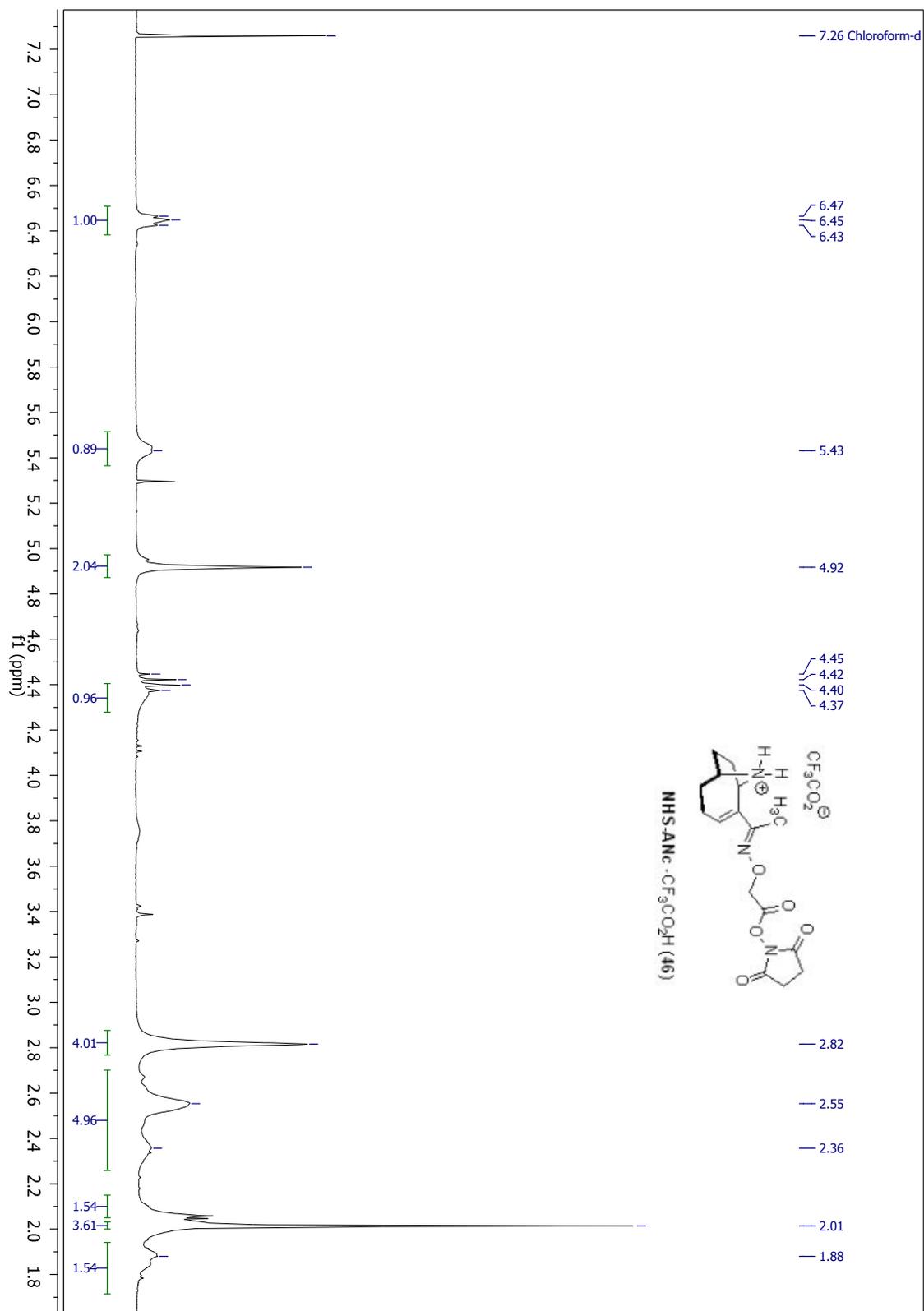
$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

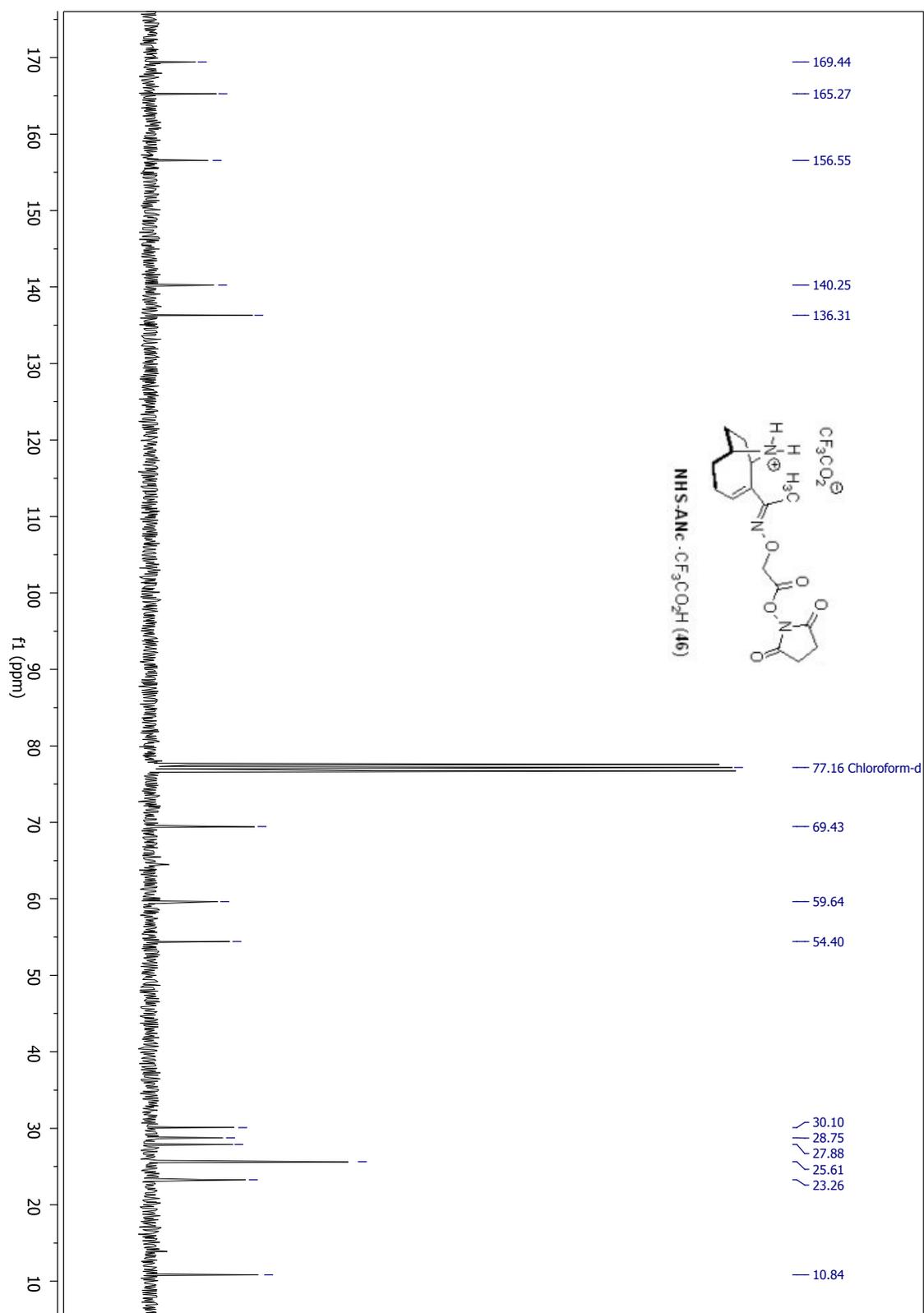
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

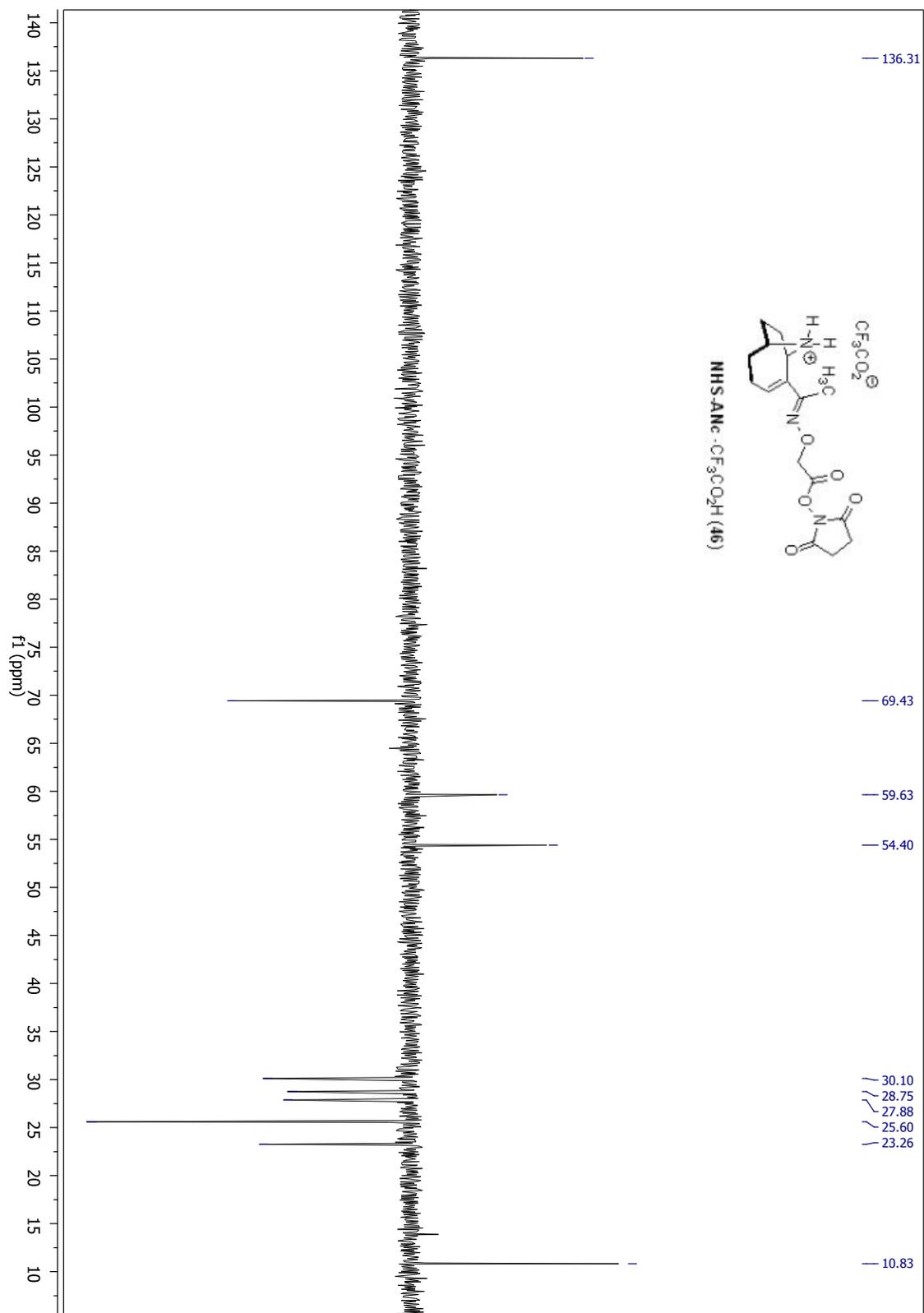
(DEPT, 75 MHz CDCl<sub>3</sub>)

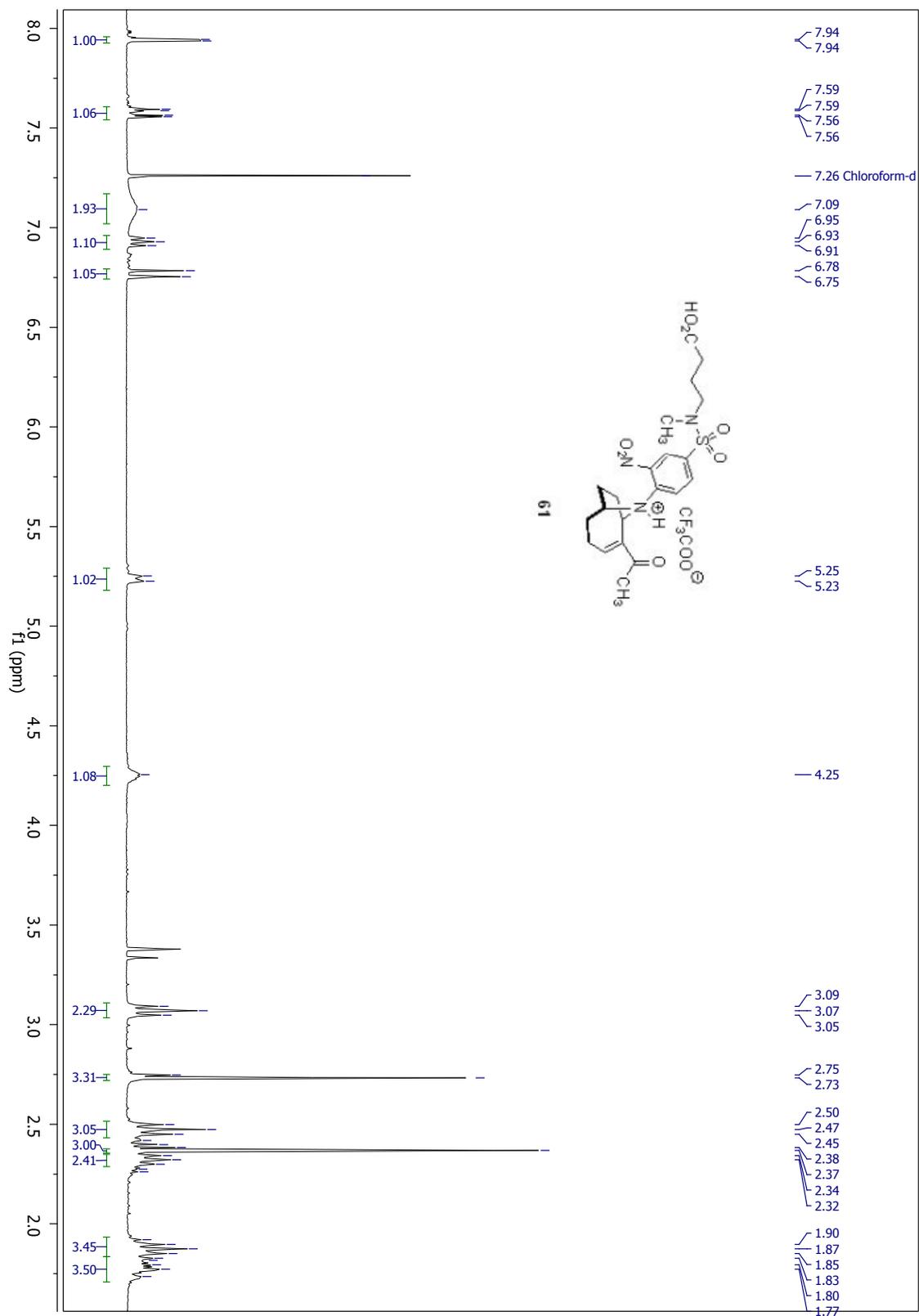
(HSQC,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

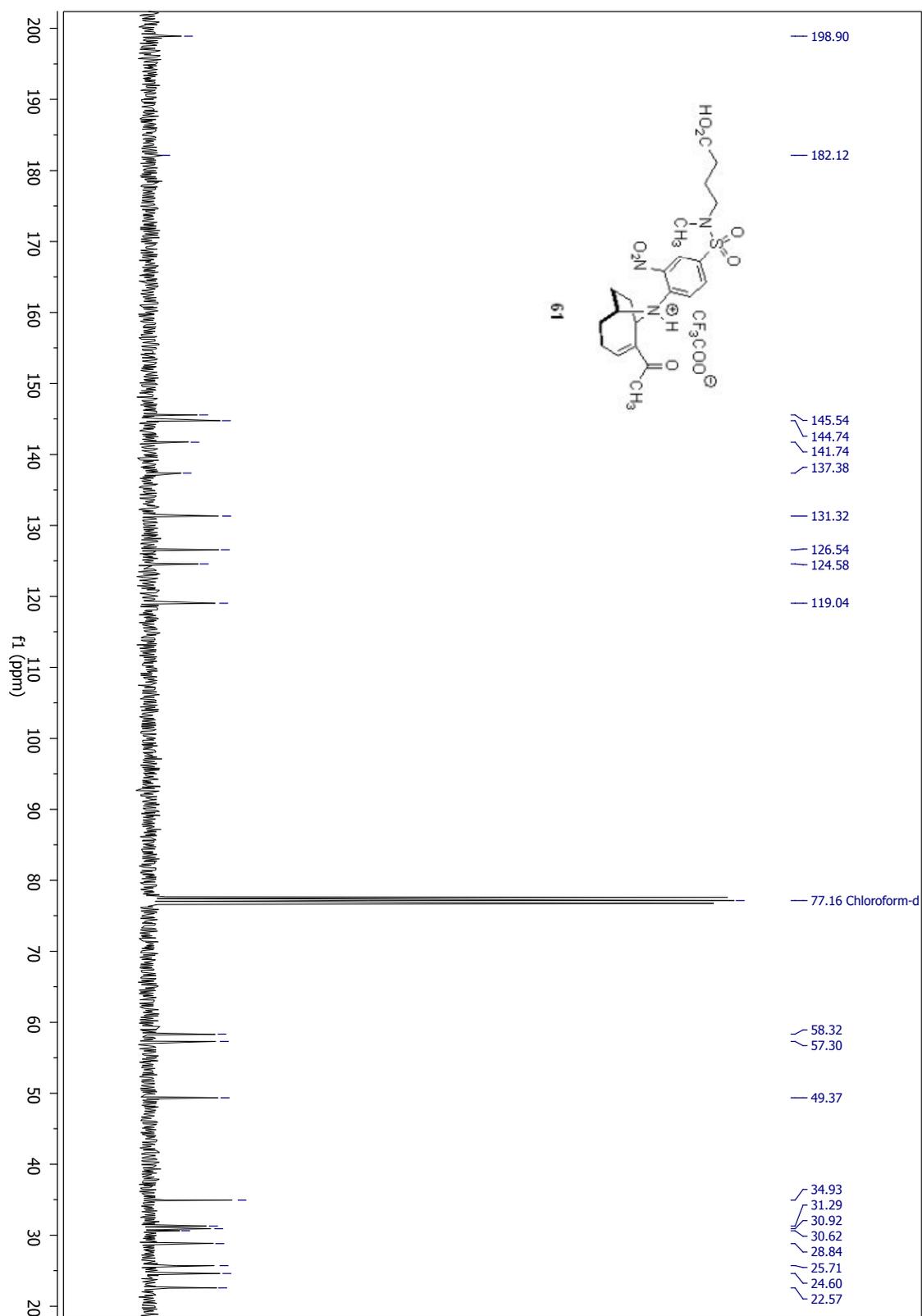
(COSY, 300 MHz CDCl<sub>3</sub>)

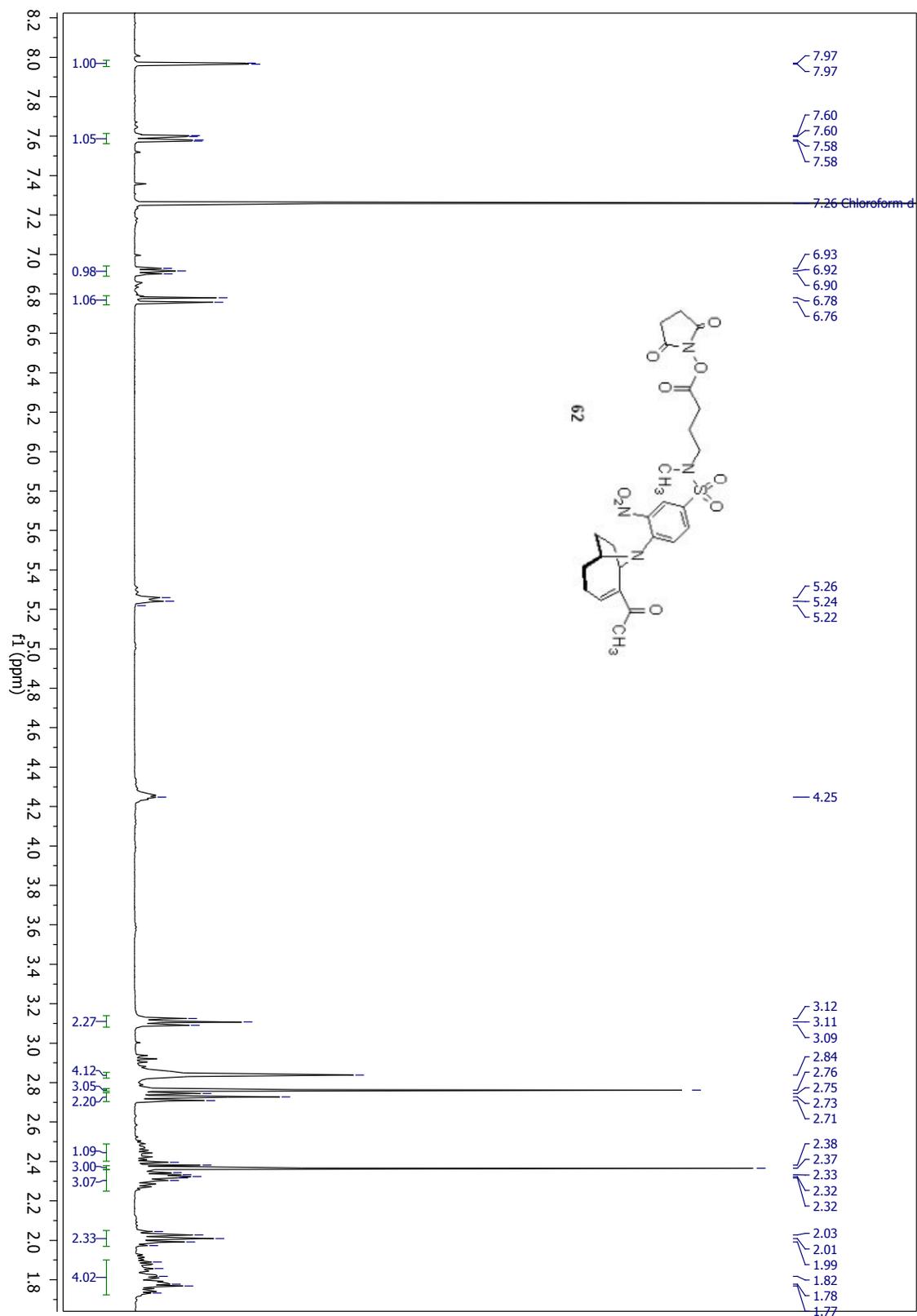
$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

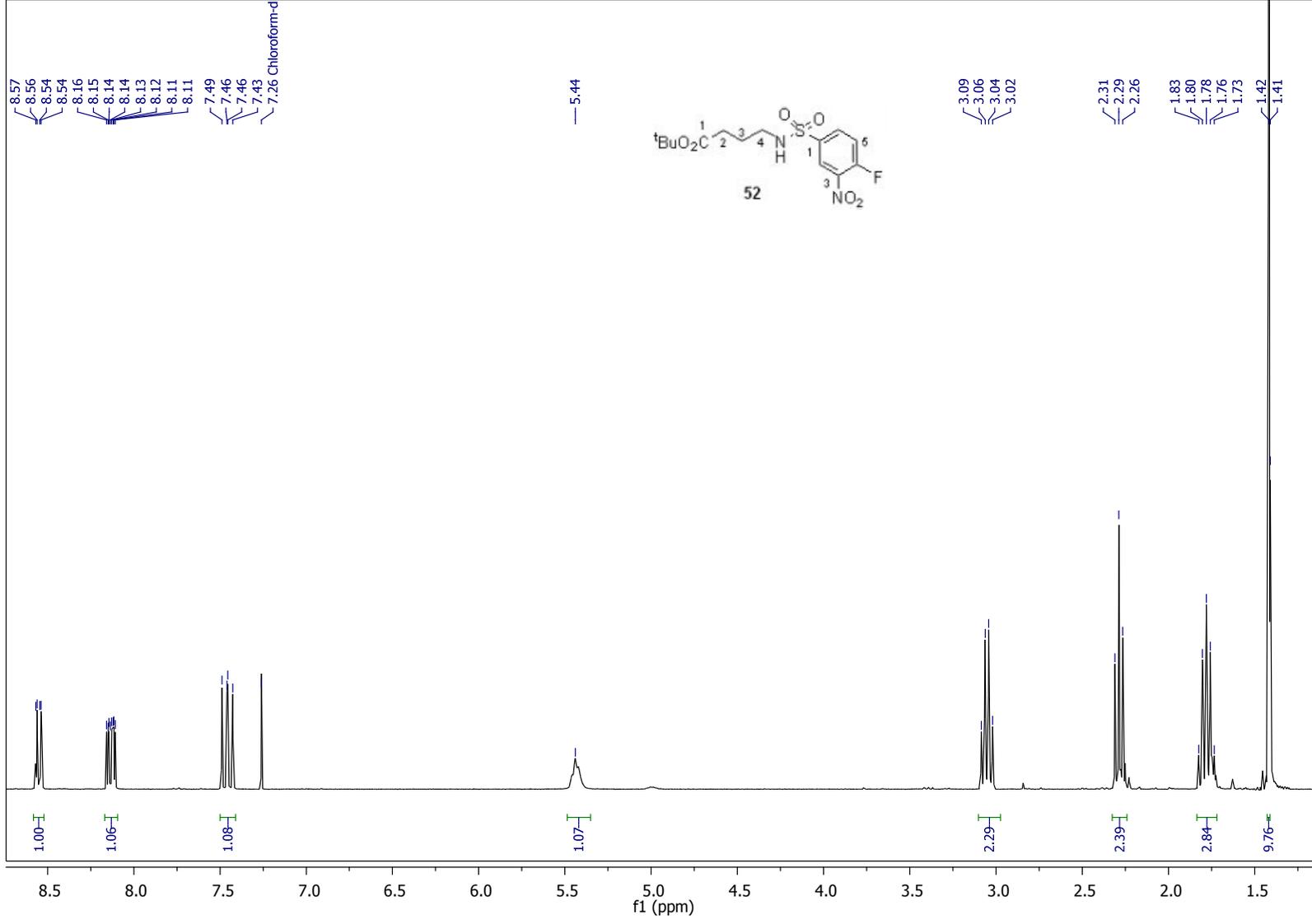
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

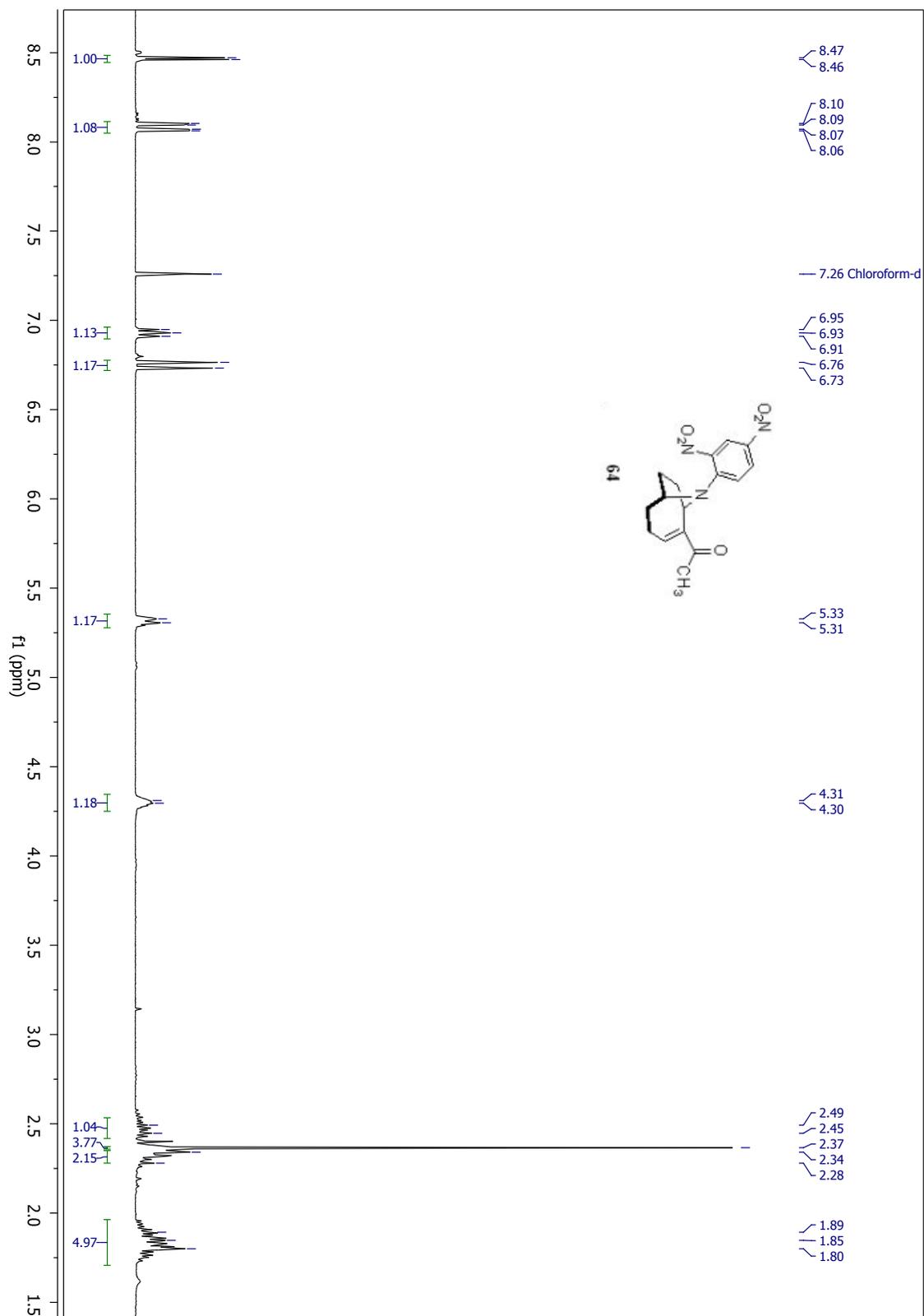
(DEPT, 75 MHz CDCl<sub>3</sub>)

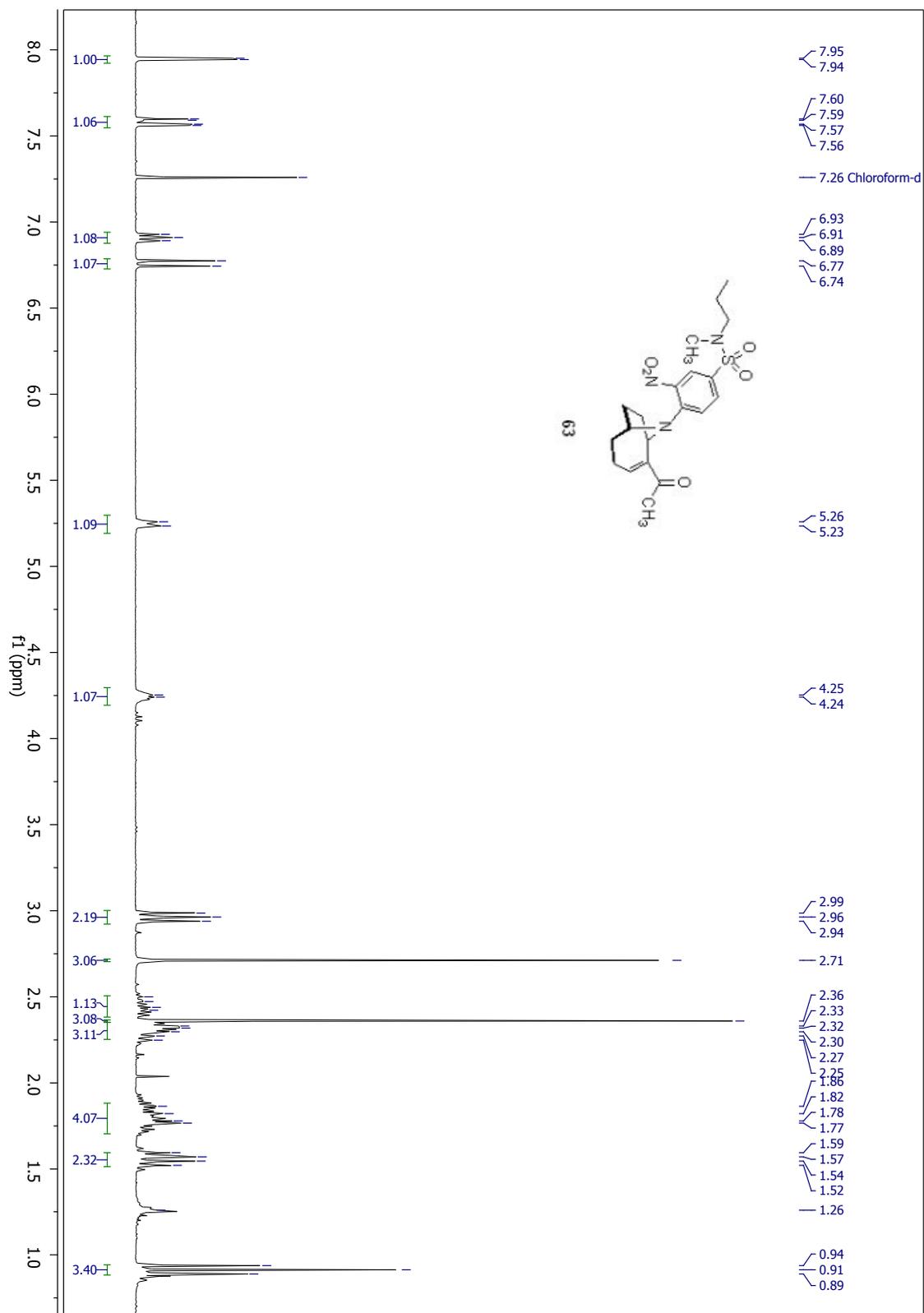
$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

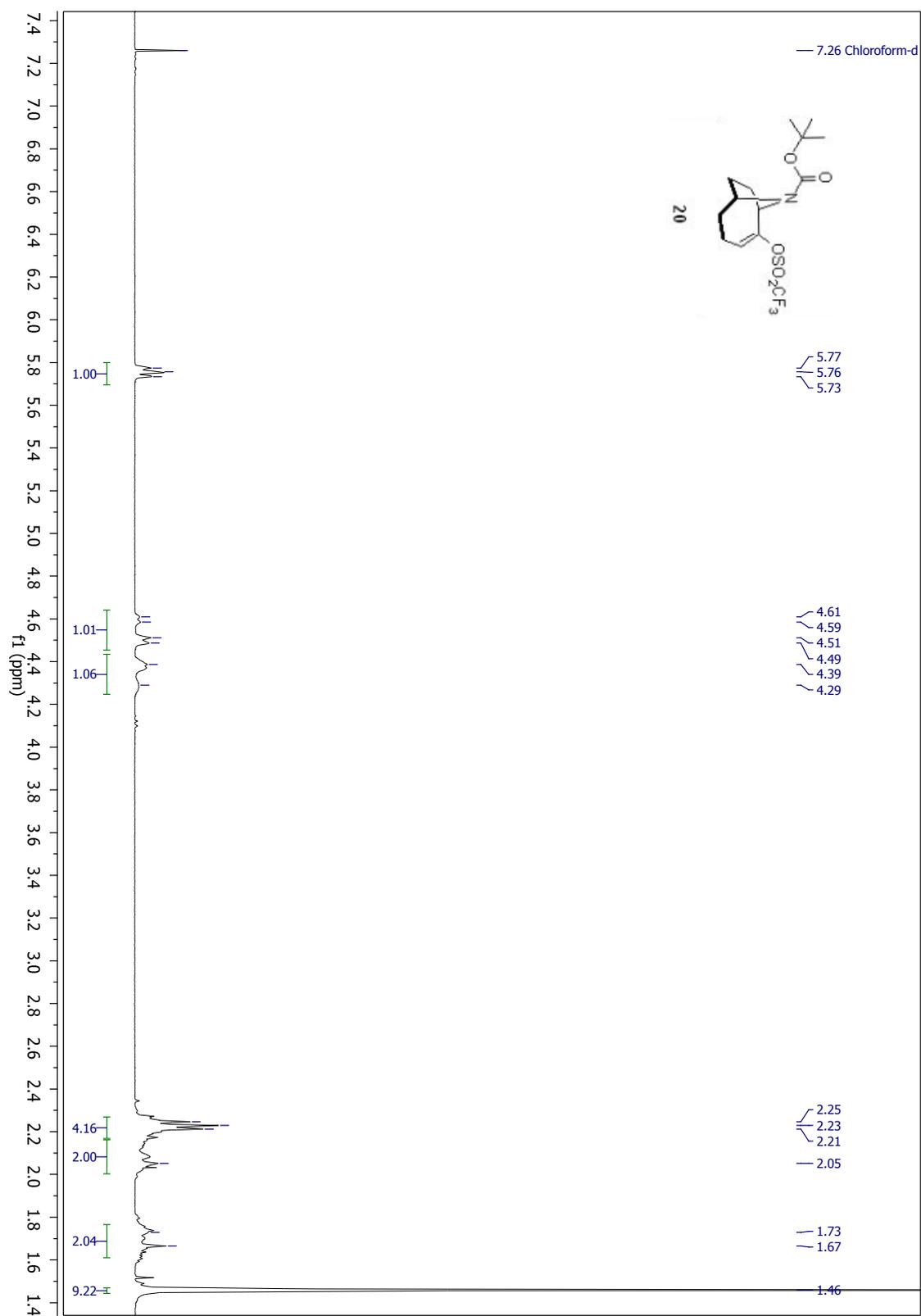
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

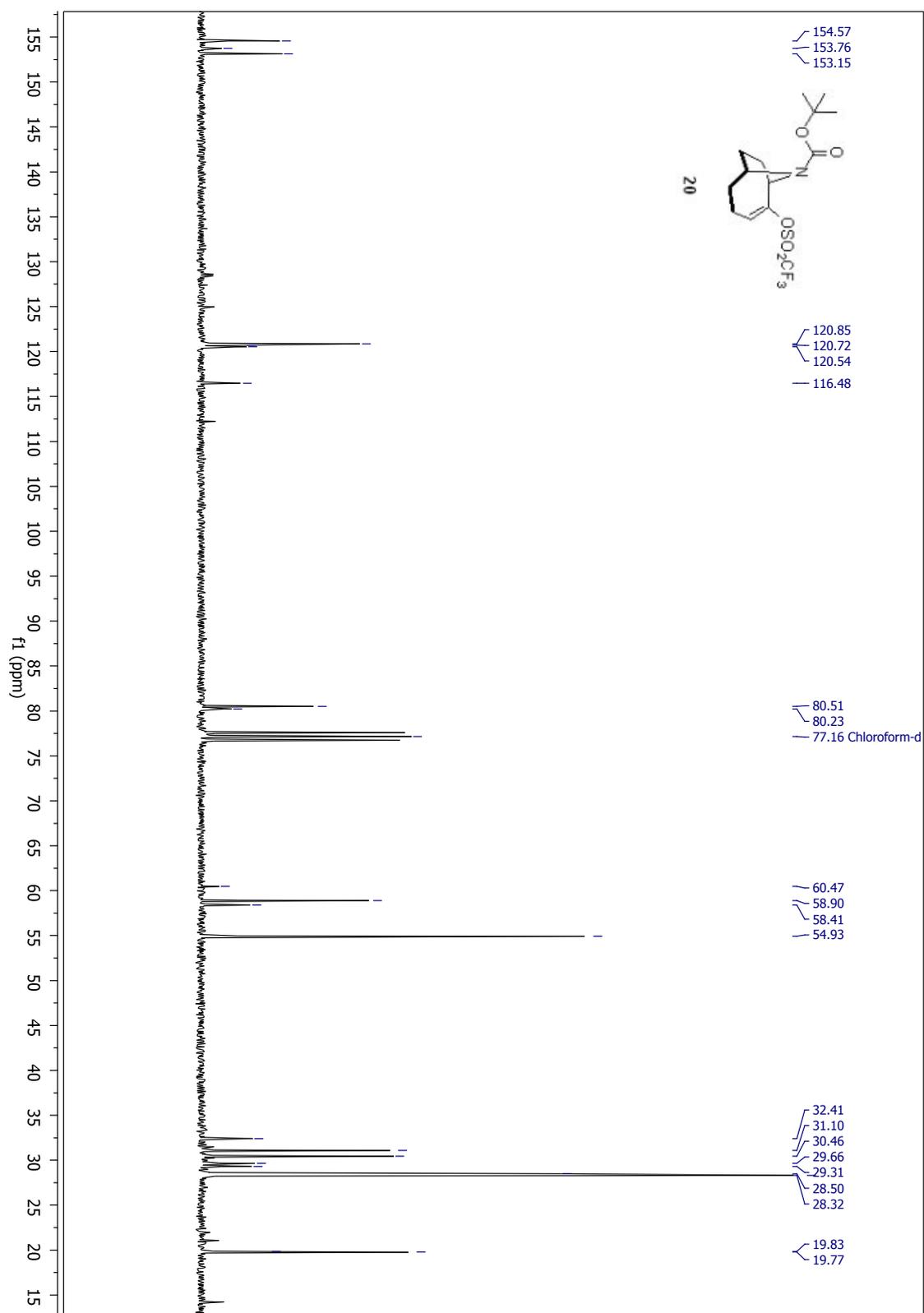
$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

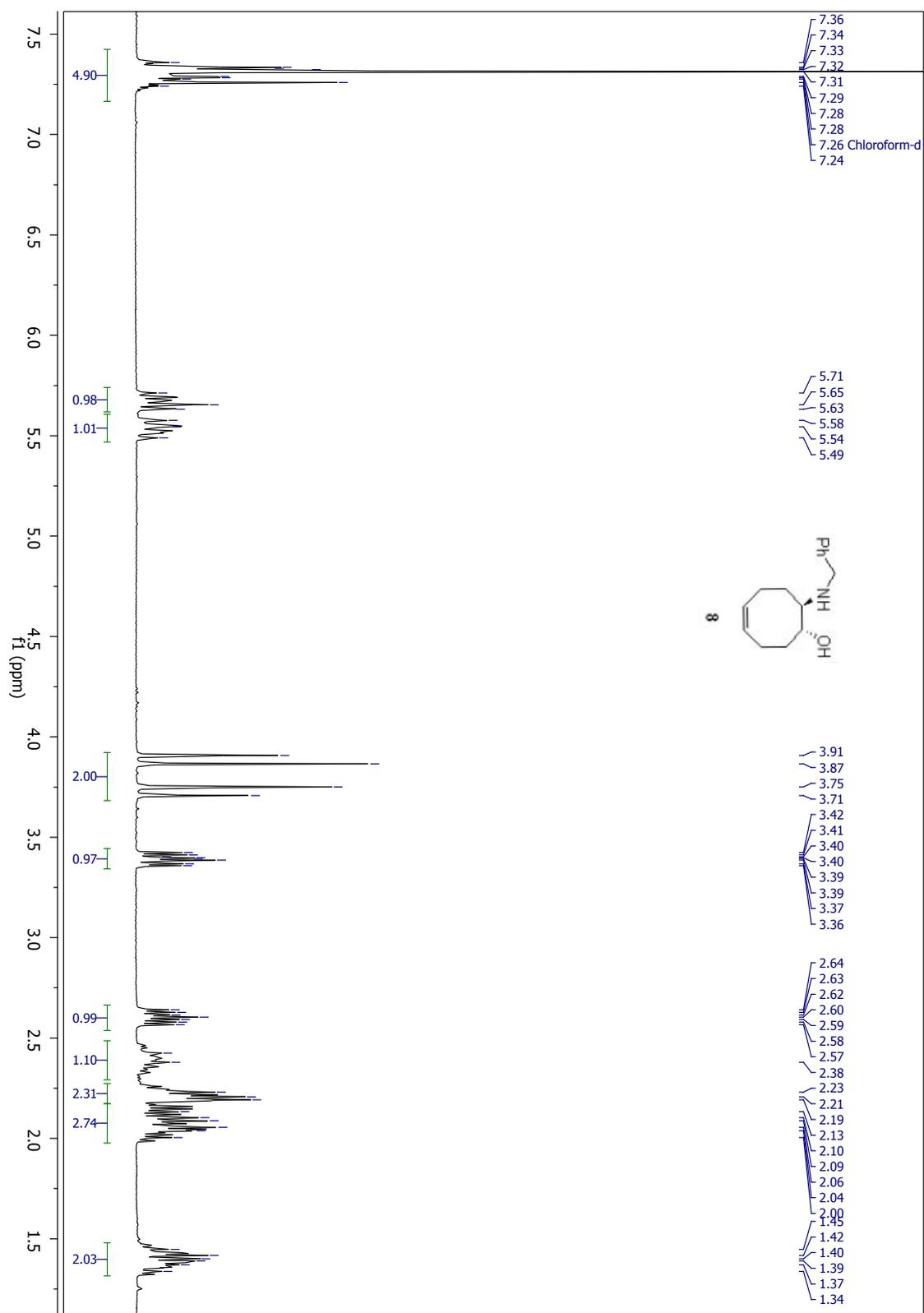
$^1\text{H-RMN}$ , 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

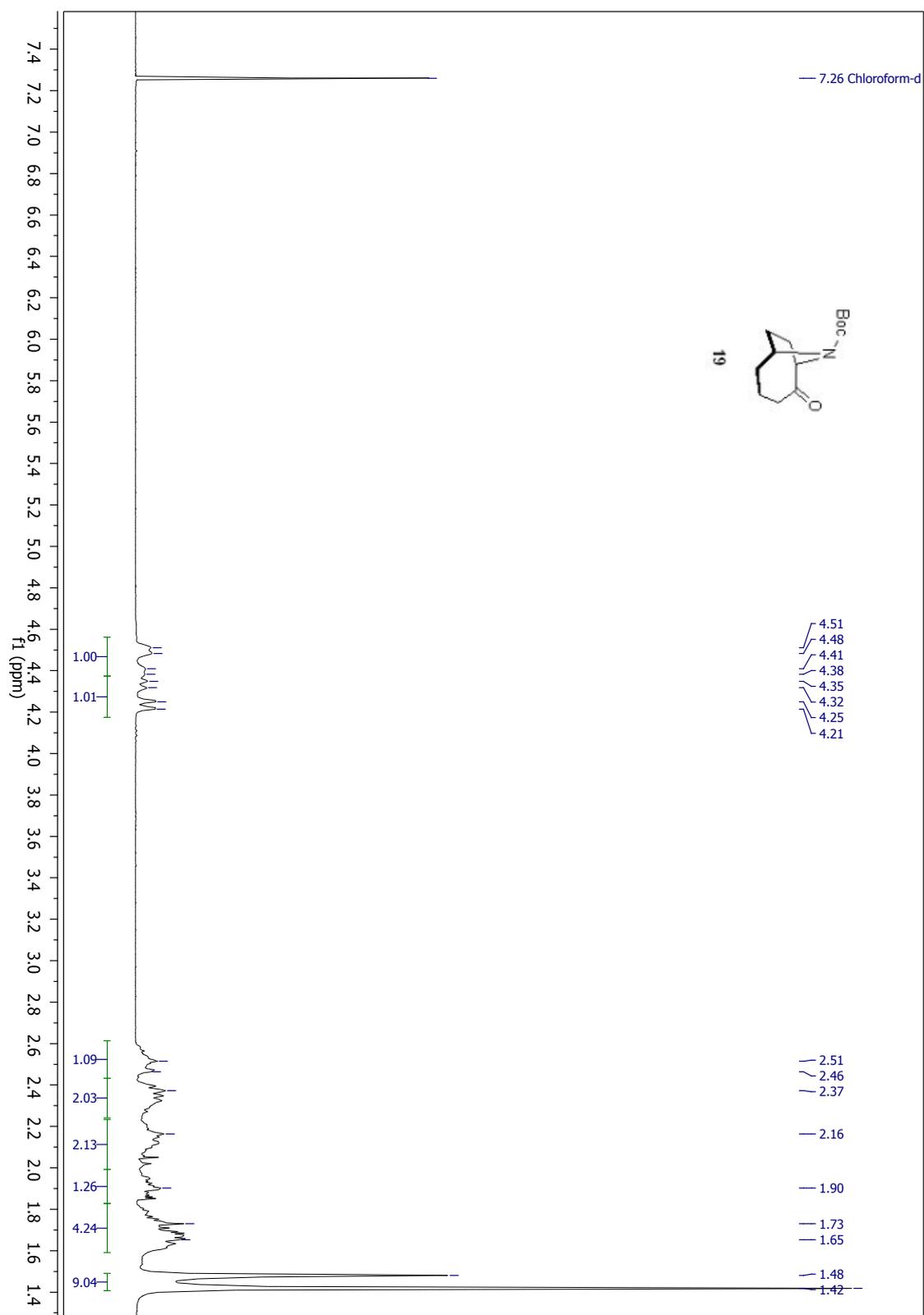
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

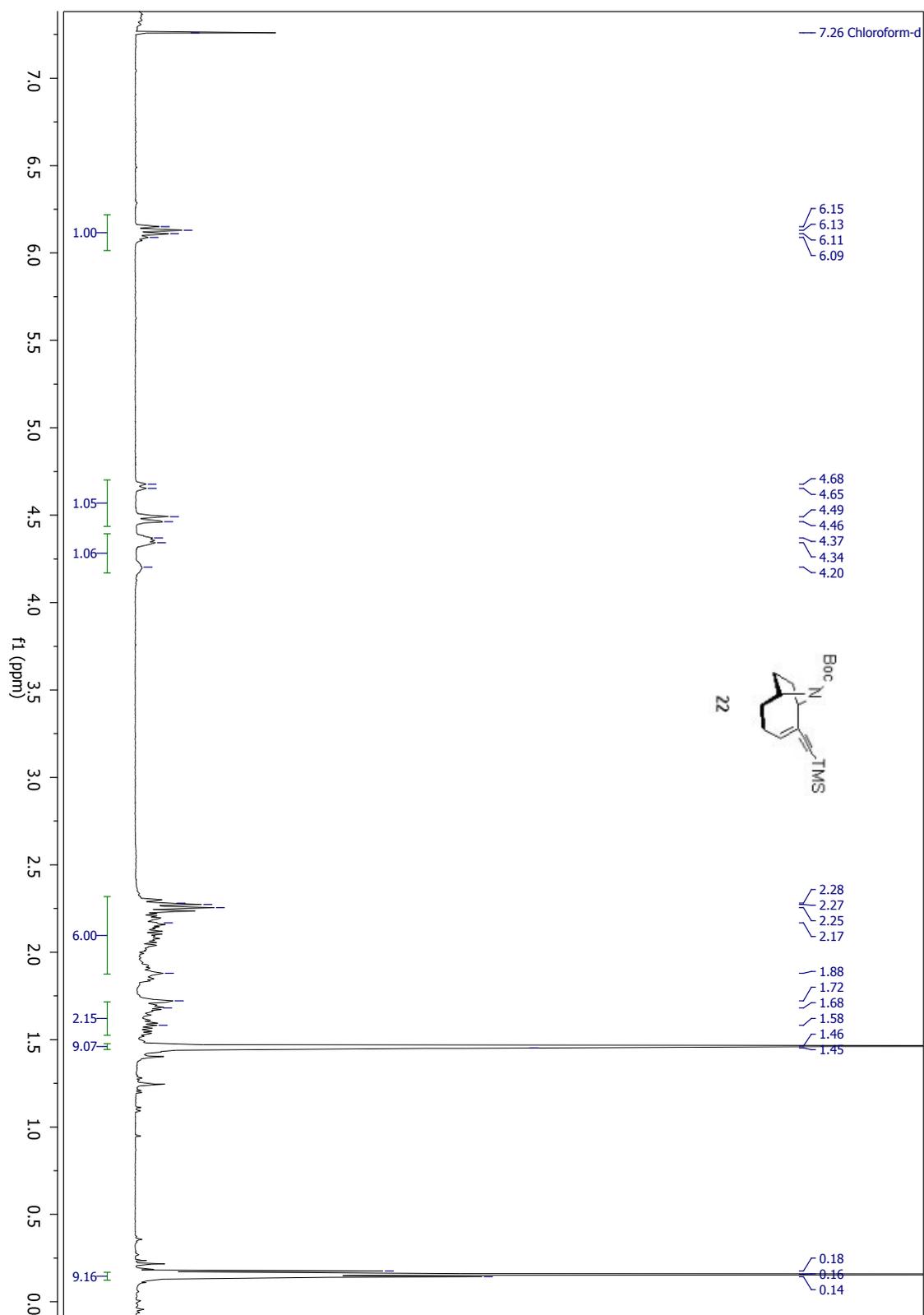
$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

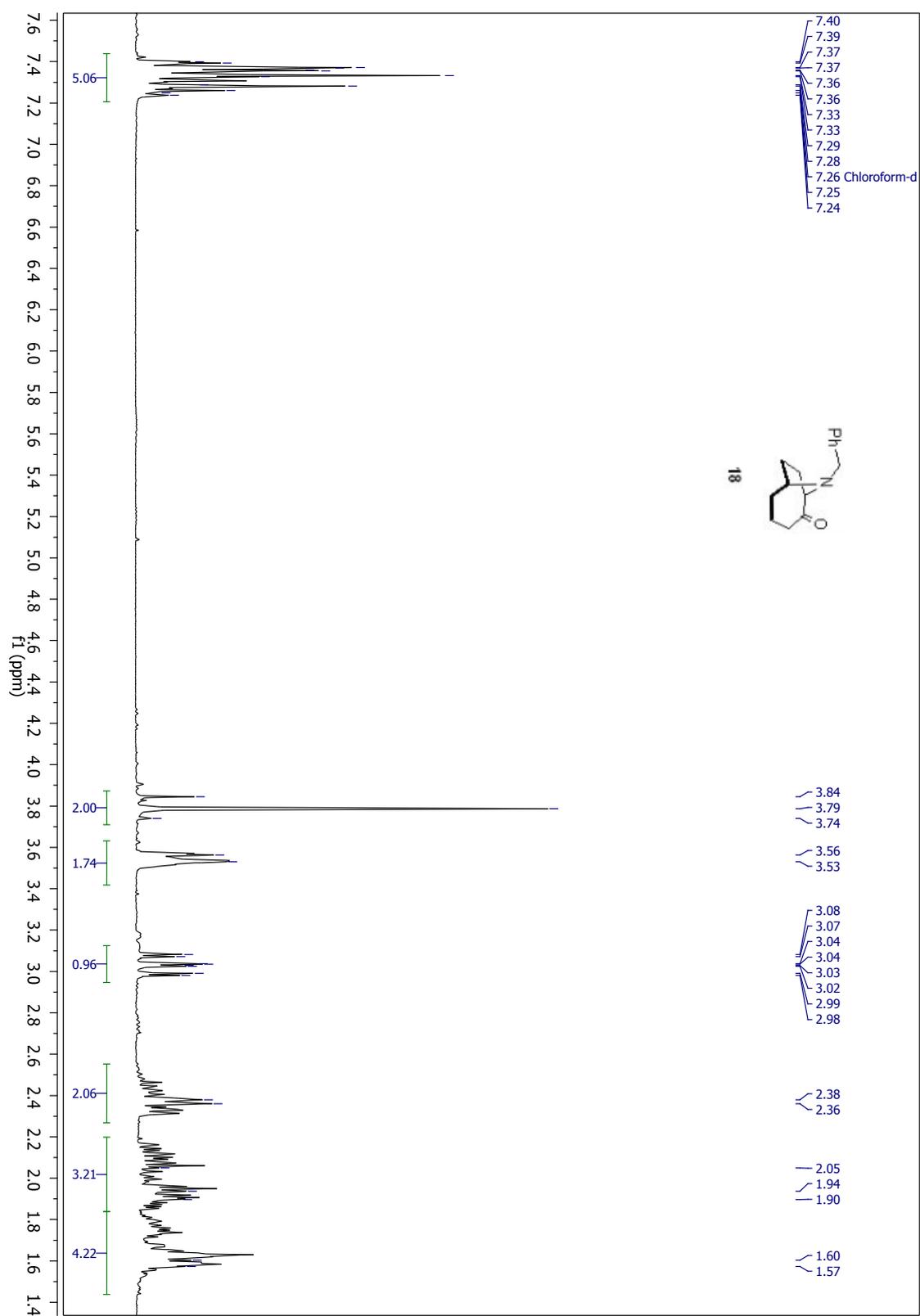
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

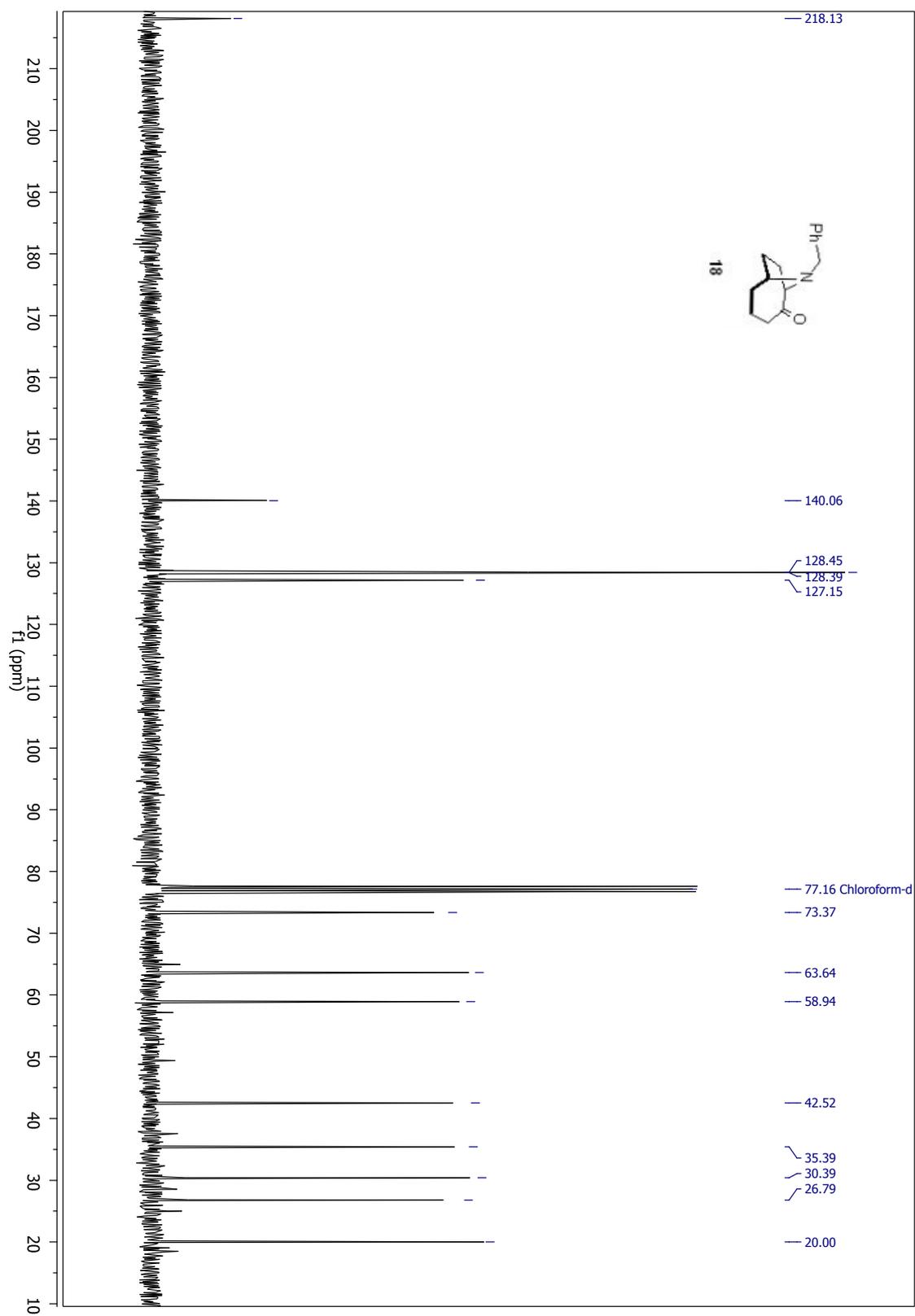
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

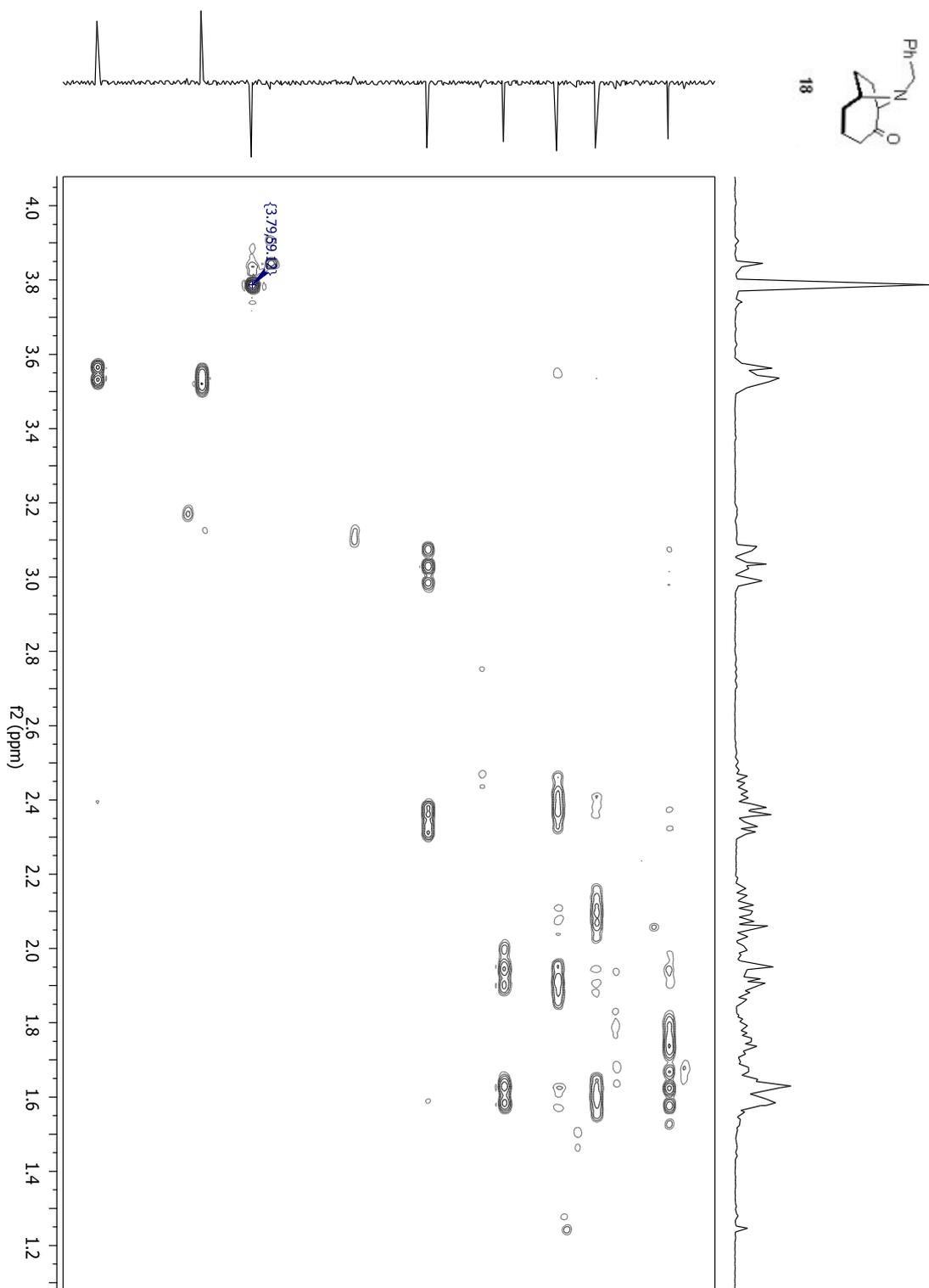
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

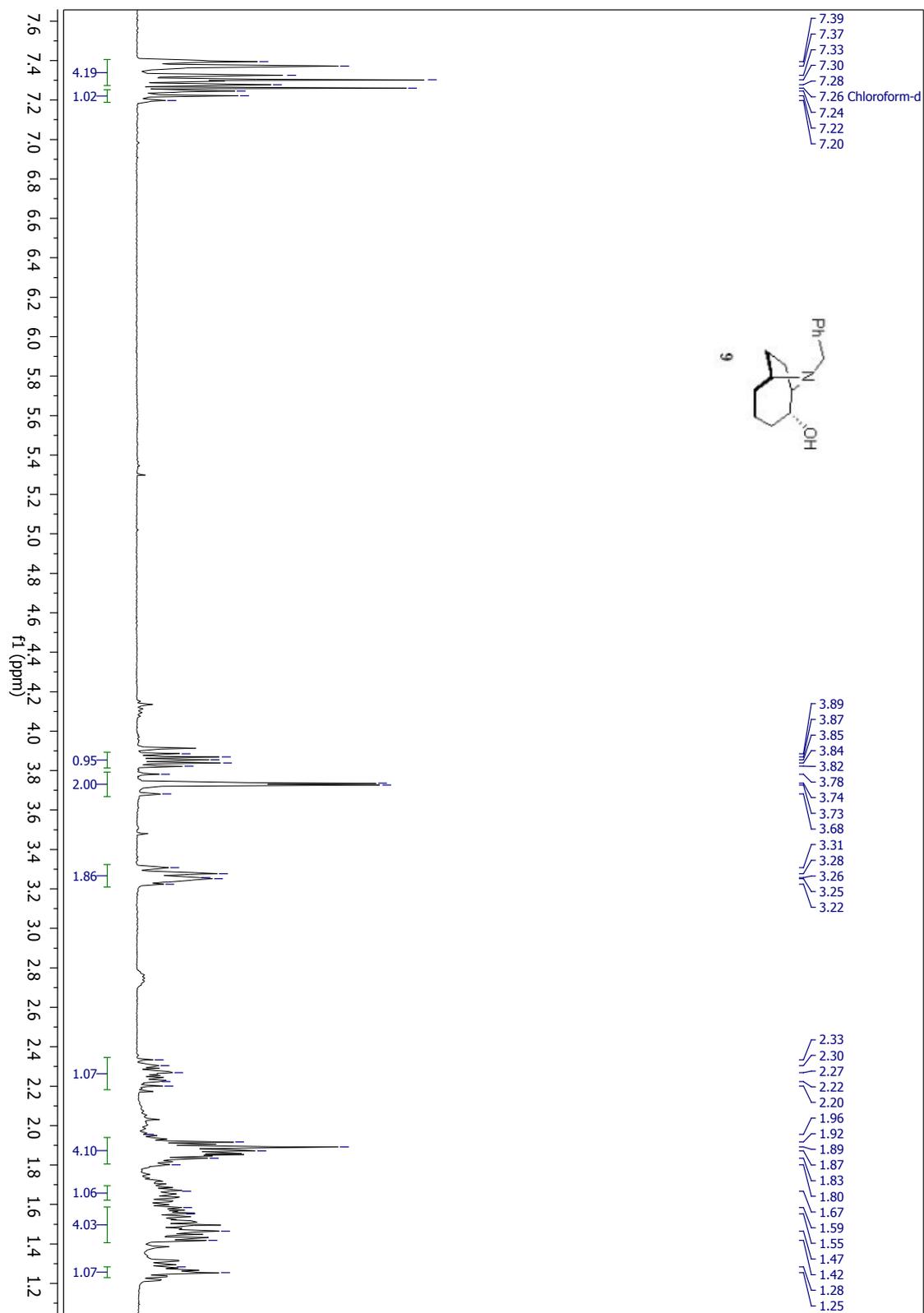
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

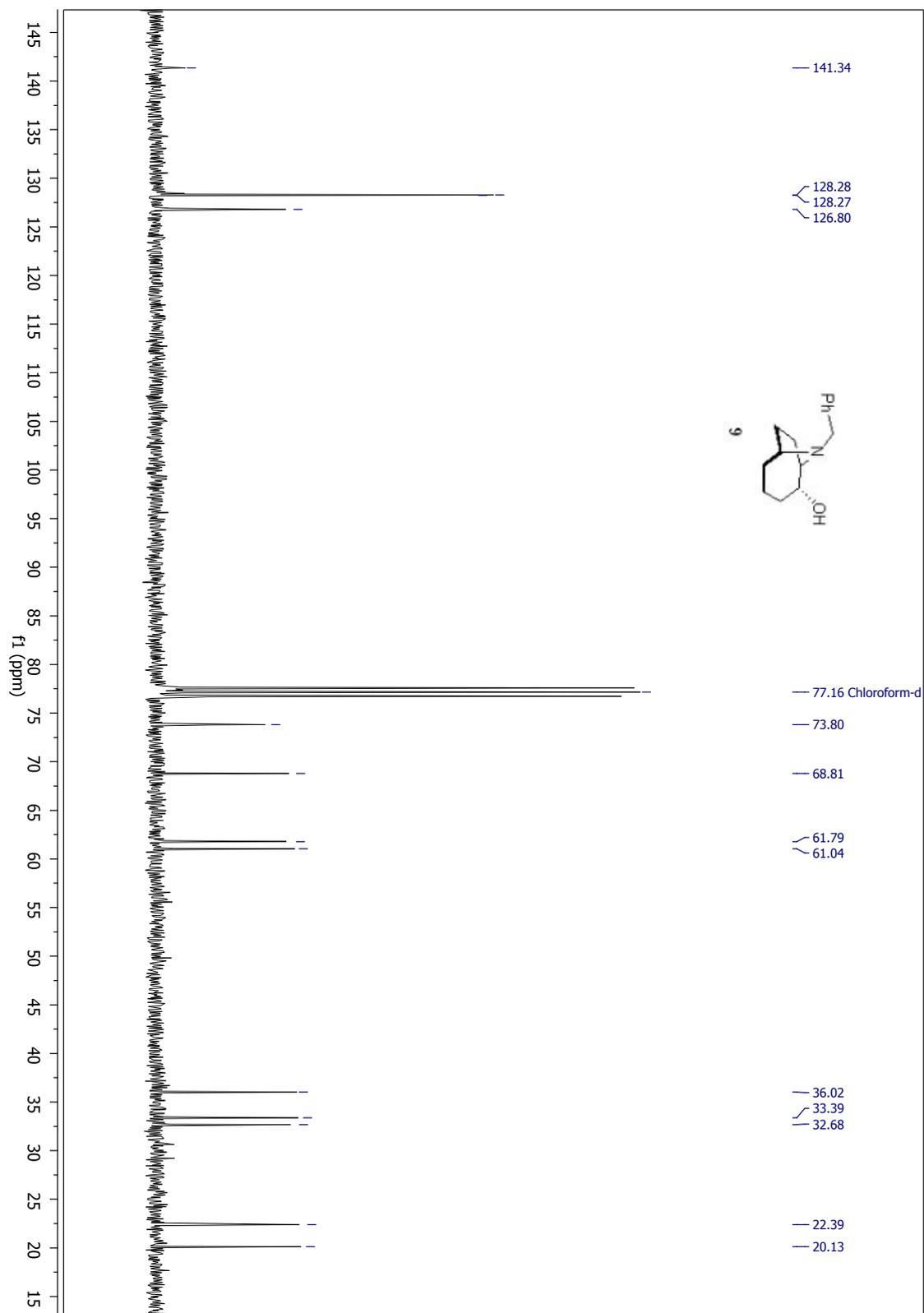
$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

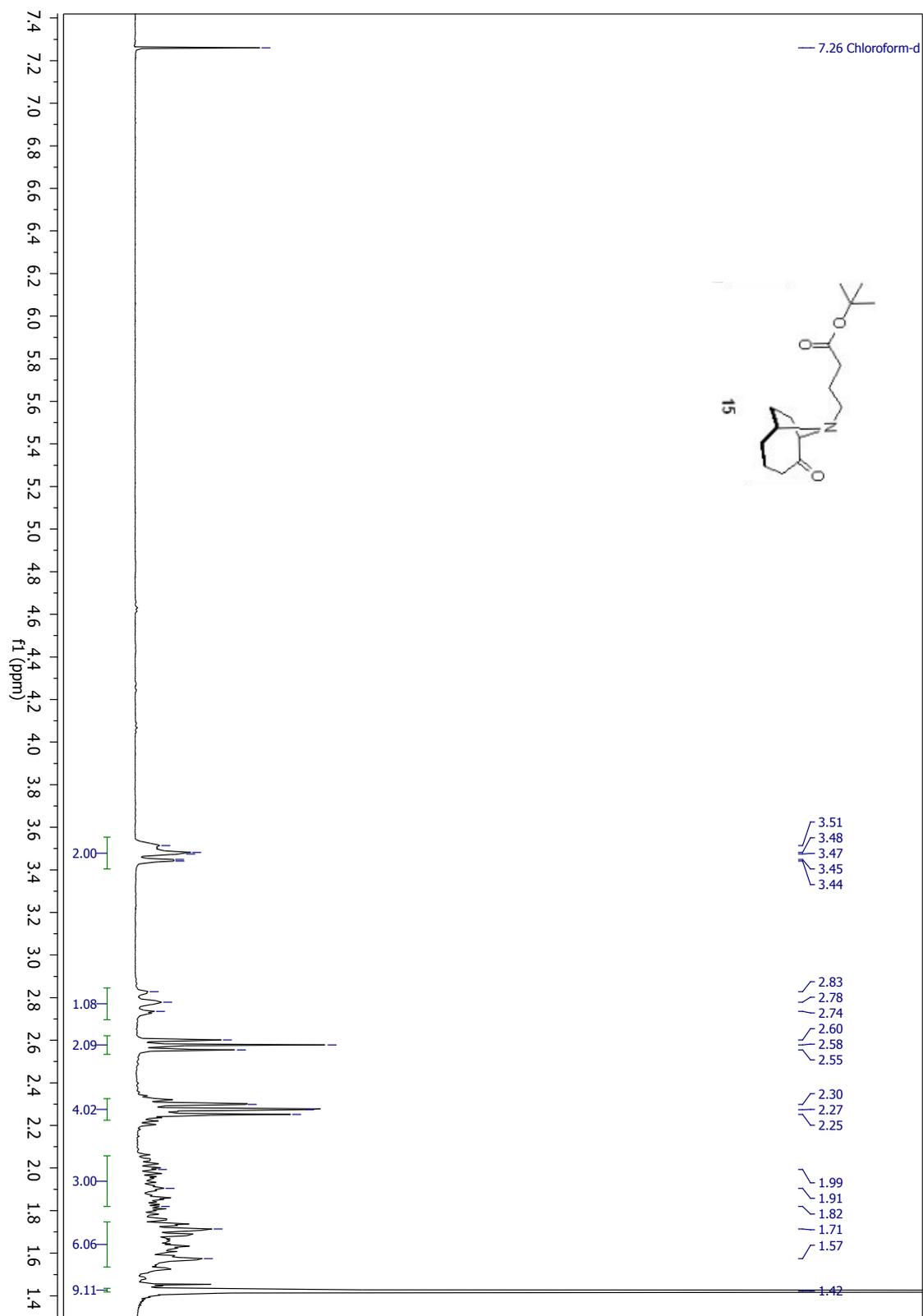
$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

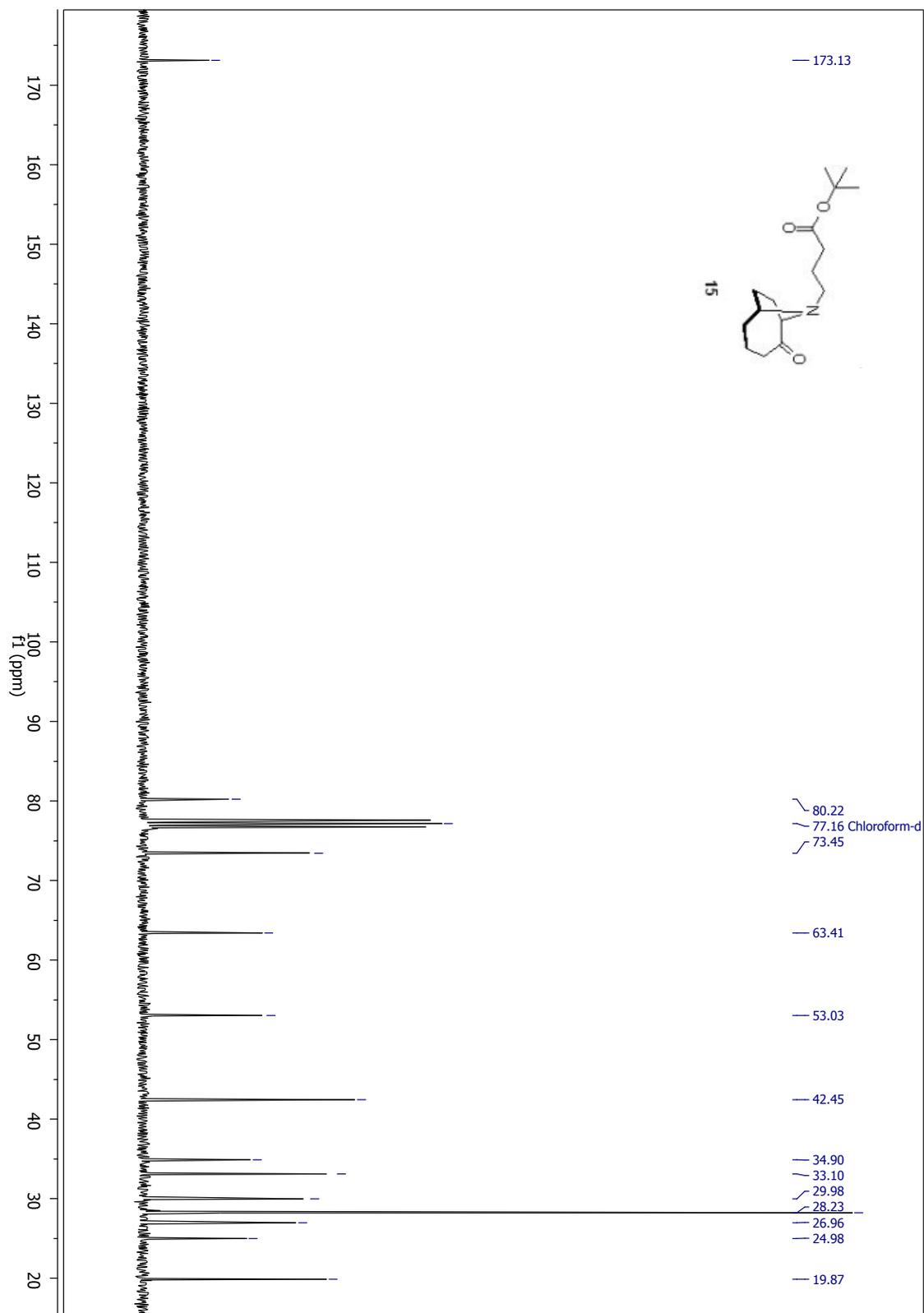
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

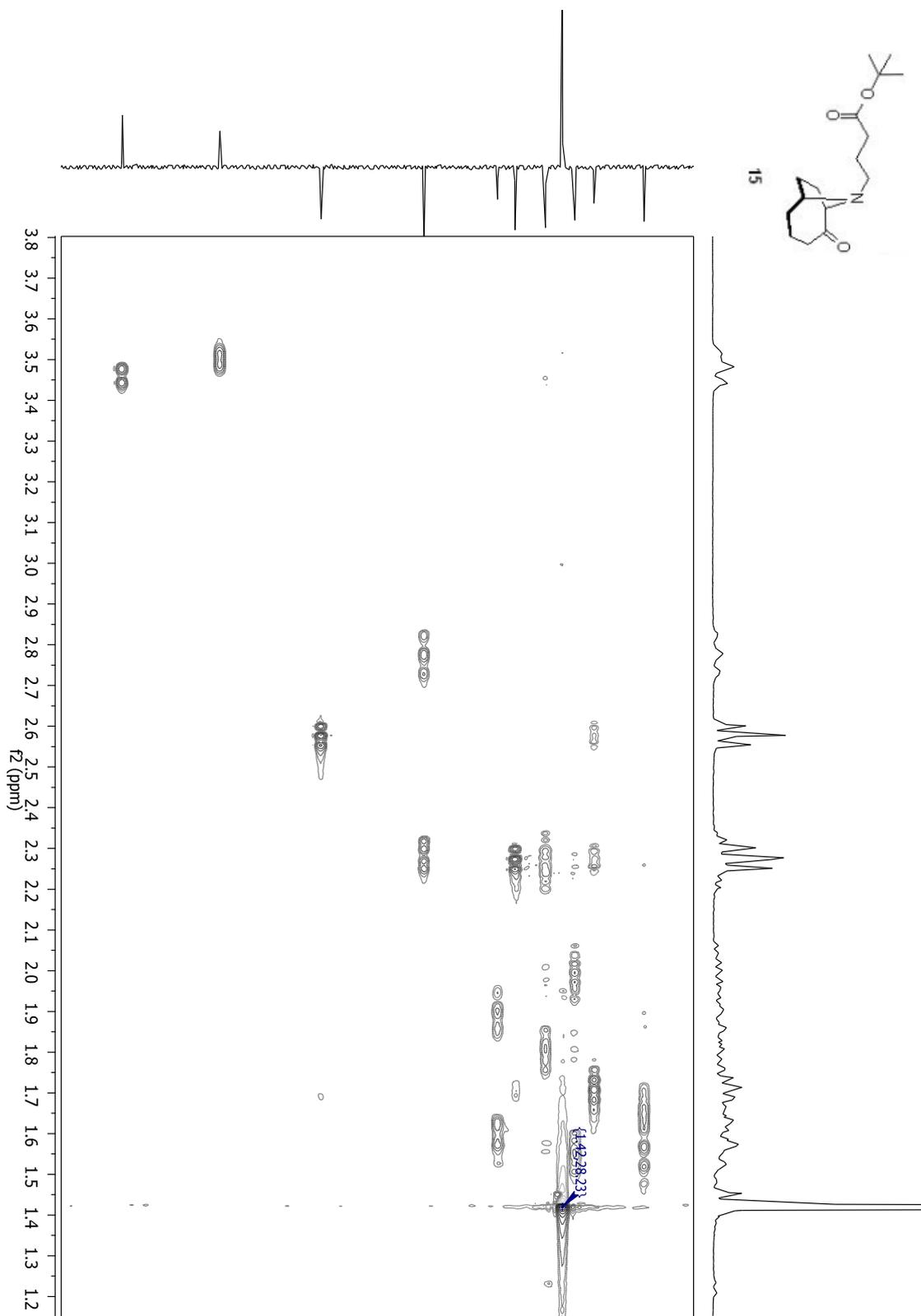
(HSQC,  $^1\text{H}/\text{DEPT}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

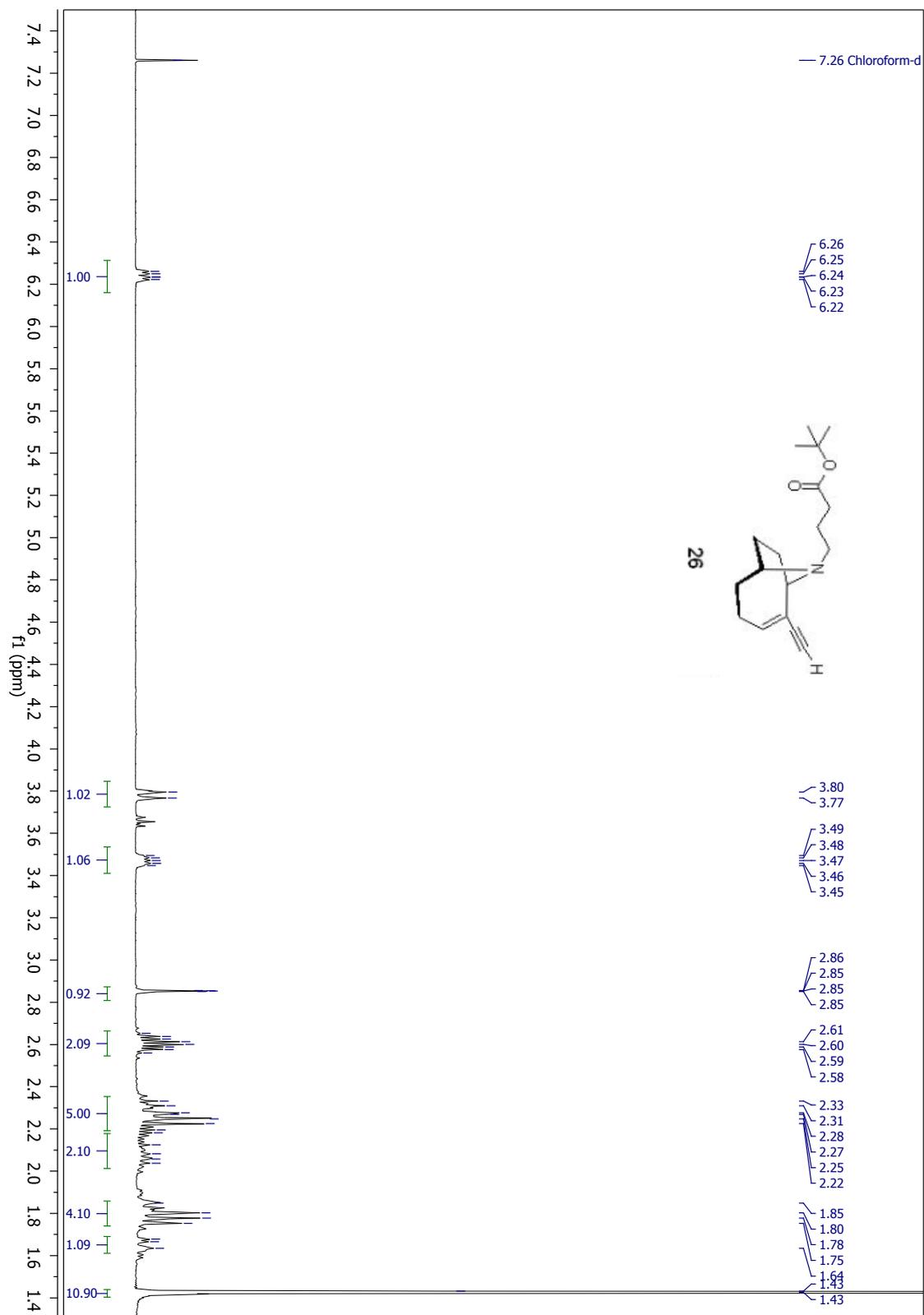
$^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz  $\text{CDCl}_3$ 

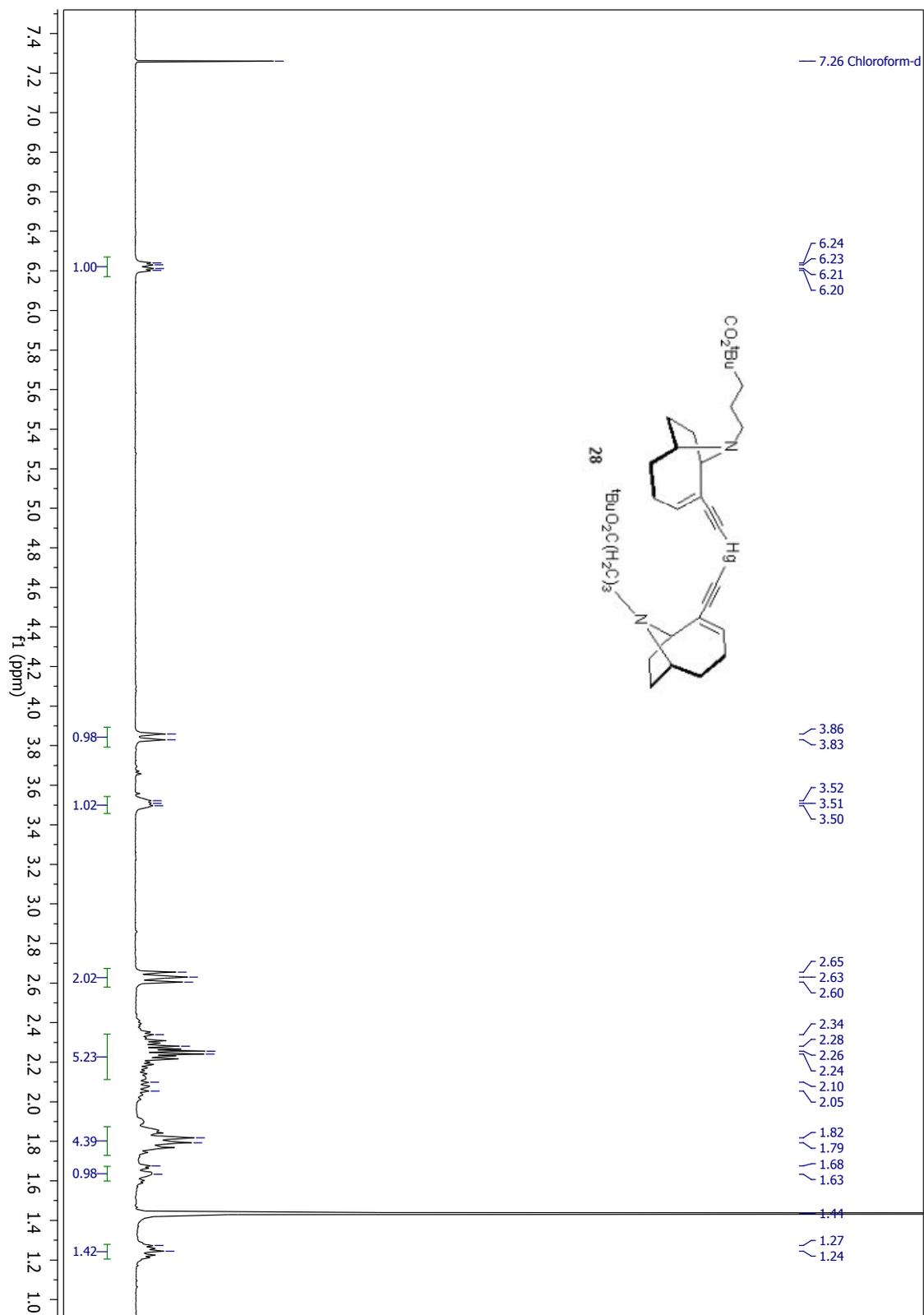
$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 

(HSQC,  $^1\text{H}/\text{DEPT}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

$(^1\text{H-RMN, 300 MHz CDCl}_3)$ 

$(^{13}\text{C-RMN}, 75 \text{ MHz } \text{CDCl}_3)$ 