



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA
Facultat de **Q**ímica
Departamento de Química
Orgánica



Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos
Departamento de **T**ecnologías de
Conservación y
Seguridad Alimentaria

Programa de Doctorado en Química (3154, R.D. 99/2011)

Estrategias alternativas para la bioconjugación de ocratoxina A y su aplicación en inmunodiagnóstico alimentario

Daniel López Puertollano

Trabajo realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia bajo la dirección del Dr. Antonio Abad Somovilla y en el Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA–CSIC) bajo la dirección del Dr. Antonio Abad Fuentes para optar al grado de Doctor en Química.

Valencia, junio de 2020

Antonio Abad Somovilla, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia

y

Antonio Abad Fuentes, Investigador Científico del Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA–CSIC)

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **Estrategias alternativas para la bioconjugación de ocratoxina A y su aplicación en inmunodiagnóstico alimentario**, ha sido realizada bajo su dirección por el Graduado en Química Daniel López Puertollano en el Departamento de Química Orgánica (Universidad de Valencia) y en el Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) y autorizan su presentación para que sea calificada como tal.

Y para que así conste a los efectos oportunos y a petición del interesado, se expide el presente certificado en Burjasot, junio de 2020.

Fdo. Dr. Antonio Abad Somovilla

Fdo. Dr. Antonio Abad Fuentes

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar en estas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado, tanto presencialmente como a distancia, en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Antonio Abad Somovilla y al Dr. Antonio Abad Fuentes, directores de este trabajo, por la oportunidad de ingresar en su grupo de investigación para realizar la presente Tesis Doctoral. Al Dr. Antonio Abad Somovilla por su orientación, seguimiento y disposición en todo momento, y al Dr. Antonio Abad Fuentes por sus consejos, apoyo, libertad total a la hora trabajar y, sobre todo, por sus direcciones y sugerencias a la hora de elaborar esta memoria.

A la Dra. Consuelo Agulló por su disponibilidad, por sus animadas conversaciones y por velar por el orden del laboratorio de Química Orgánica y al Dr. Josep V. Mercader por sus consejos y experiencia compartida durante el desarrollo de los inmunoensayos, especialmente los inmunocromatográficos.

Gracias al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por la ayuda predoctoral FPU (FPU14/05266), por el sustento económico y por permitirme impartir docencia. Esta tesis se enmarca dentro de los proyectos “Producción de anticuerpos y generación de metodologías inmunoquímicas para la detección de biotoxinas (AGL2015-64488)” y “Nuevos anticuerpos monoclonales para la detección *in situ* de micotoxinas en frutas, cereales y productos procesados mediante métodos inmunoquímicos (RTI2018-096121)” financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad y en el proyecto “Desarrollo de un test inmunocromatográfico para el análisis rápido de ocratoxina A en vinos (AICO/2018/111)” financiado por la Conselleria d’Educació, Investigació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana.

He de agradecer también a mis compañeros de laboratorio Javi, Hadyn, Luis, Ramón, José y Giovanni por el buen ambiente de trabajo, y sobre todo a Paula por su gran ayuda en el laboratorio de cultivos, así como a todas las personas que han pasado por el departamento y que han contribuido de alguna manera a mi desarrollo ocio-científico: Eric, Víctor, Lode, Ruth, Carlos, Pablo, Verena, Jaume, Marta y Jennifer. A mis amigos y compañeros de Máster, en especial a Ofelia, Carlos y Estefanía por las salidas a la montaña y por todas esas *escape rooms* que tanto nos costaba cuadrar en horarios. A mis amigos de Jaén por estar dispuestos a una cena *express* las escasas ocasiones que paso por mi tierra, y en especial a Clara, Joan y Pablo por sus conversaciones *random* vía *Whatsapp*. A los aurgitanos en Valencia, especialmente a Dina, por los buenos momentos desde que llegué a esta ciudad. Por último, a Thais por esas cervezas de viernes tarde y por su ayuda con el diseño de la portada de esta Tesis.

Para finalizar, tengo que agradecer el apoyo de mi familia, en especial a mi padre Antonio y a mi madre M^a Rosa, que me vio empezar esta aventura, pero no ha podido ver cómo acaba. Sé que estaría orgullosa, aunque no entendiera nada de lo escrito en esta memoria. Al final sí que seré doctor, si he podido llegar hasta aquí ha sido gracias a vosotros.

RESUMEN

Ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario producido por hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*. Esta micotoxina puede encontrarse en una gran variedad de alimentos, entre los que se encuentran cereales, café o vino. OTA es un potente carcinógeno en roedores, motivo por el que se encuentra clasificado en el grupo 2B (posible carcinógeno para humanos) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. Con el objetivo de reducir la exposición de los consumidores a esta micotoxina, la Comisión Europea ha establecido concentraciones máximas en varias matrices alimentarias, siendo este límite de 2 µg/L en el caso de vino y zumo de uva. Entre las diferentes técnicas analíticas para la detección de OTA, los métodos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y los ensayos de flujo lateral (LFIA, *Lateral Flow ImmunoAssay*) son métodos ampliamente utilizados debido a su simplicidad, bajo coste, portabilidad y alta capacidad de análisis. Se ha publicado en la literatura científica un gran número de inmunoensayos para la detección de OTA, pero en todos ellos los conjugados empleados, tanto de inmunización como de ensayo, fueron preparados mediante el acoplamiento directo de esta micotoxina a proteínas empleando el grupo carboxilo presente en su estructura.

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en la síntesis de nuevos derivados funcionalizados de ocratoxina A (haptenos) y en el uso de los mismos para el desarrollo de inmunoensayos que permitan la detección de esta micotoxina en alimentos con elevada sensibilidad y especificidad. Los nuevos haptenos fueron químicamente sintetizados manteniendo libre el grupo carboxilo de la toxina, con el objetivo de que este pudiese participar en la interacción antígeno–anticuerpo. La hipótesis de partida planteaba que la presencia de dicho grupo en los conjugados destinados a inmunización de animales de laboratorio permitiría la producción de anticuerpos con mejores prestaciones analíticas. Dos de estos haptenos fueron preparados con grupos carboxilo en posiciones distales de la estructura de OTA, manteniendo libre el carboxilo propio de la toxina. Además, se prepararon dos haptenos con un grupo azida en el extremo del brazo espaciador con el objetivo de evaluar la viabilidad de la generación de anticuerpos a partir de conjugados proteicos obtenidos a través de una reacción de cicloadición de Huisgen 1,3-dipolar catalizada por cobre (I) (CuAAC), el ejemplo clásico de reacción “click”.

La importancia del grupo carboxilo nativo de OTA se confirmó mediante la evaluación de anticuerpos policlonales de conejo. Los antiseros producidos a partir de haptenos con dicho grupo carboxilo libre mostraron afinidades hacia OTA superiores a aquellos que se obtuvieron a partir de conjugados preparados a través del mismo. Además, se obtuvo una buena respuesta inmune a

partir de los bioconjugados preparados mediante química “click”, demostrando que la presencia del anillo de triazol en el brazo espaciador producto del acoplamiento no impide la generación de anticuerpos de elevada afinidad. Finalmente, se llevó a cabo la producción de anticuerpos monoclonales de ratón a partir de todos los haptenos sintetizados y, tras su caracterización mediante ELISA competitivo, las mejores combinaciones de inmunorreactivos se utilizaron para el desarrollo de un ELISA y de tiras inmunorreactivas para la detección de OTA en vino y zumo de uva. Las características analíticas de los ensayos desarrollados fueron similares o superiores a los kits comerciales evaluados.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by several species of *Aspergillus* and *Penicillium*. This mycotoxin can be found in a wide variety of foodstuffs, including cereals, coffee and wine. OTA is a strong carcinogen for rodents and it is classified into group 2B (possible human carcinogen) by the International Agency for Research on Cancer (IARC). In order to protect consumers from exposure, the European Commission has established regulations concerning OTA levels in several foodstuffs, being wine and grape juices the commodities with the most demanding limit (2 µg/L). Among the different analytical techniques employed nowadays for OTA detection, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or the lateral flow immunoassay (LFIA) are popular methods because they are rapid, affordable, simple, portable and high throughput. Noticeably, in all immunoassays for OTA detection developed so far, the employed immunizing and assay conjugates were obtained using the native carboxylic group of the mycotoxin for protein coupling.

This PhD Thesis has focused on the synthesis of a novel set of OTA functionalised derivatives (haptens), their use for the generation of new antibodies and the development of immunoanalytical techniques for the detection of this mycotoxin in foodstuff. Those new haptens were chemically synthesised by introducing the functionalised spacer arm at positions other than the native carboxylic moiety of OTA, so this group may participate in the antibody–analyte interaction. Our hypothesis was that bioconjugates based on those novel haptens may elicit the generation of antibodies with superior binding properties. Two of these new haptens were prepared with a carboxylic group at the end of the spacer arm, thus allowing their coupling to proteins by carbodiimide chemistry. Additionally, two novel haptens were synthesised bearing an azide group in the linker in order to test the feasibility of producing antibodies using protein conjugates prepared by copper(I)-catalysed Huisgen 1,3-dipolar azide–alkyne cycloaddition (CuAAC), the prototypical example of click chemistry reactions.

The relevance of the native carboxylic group in the antibody–analyte interaction was first confirmed by assessing the immune response in rabbits. Polyclonal antibodies (pAbs) obtained from haptens displaying the free native carboxylic group showed higher affinities than antisera from haptens conjugated through this group. Moreover, adequate immune responses to OTA were found from click chemistry-assisted bioconjugates, thus demonstrating for the first time that the presence of a triazole ring in the spacer arm does not handicap the generation of antibodies suitable for immunodiagnostics. Thereafter, mouse monoclonal antibodies (mAbs) with

subnanomolar affinities towards OTA were produced from all haptens and, following characterization of their binding properties in different formats with homologous and heterologous conjugates, the best immunoreagent combinations were used to develop ELISAs and immunostrips for the detection of this mycotoxin in grape wine and juice samples. Remarkably, the analytical characteristics of these new immunochemical methods favourably compare with the performance of commercial kits.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OCRATOXINA A.....	3
1.1.1. Biosíntesis de ocratoxina A	4
1.1.2. Síntesis química de ocratoxina A.....	6
1.1.3. Toxicidad y metabolismo de ocratoxina A	9
1.1.4. Marco legal.....	11
1.1.5. Incidencia en alimentos.....	12
1.2. ANÁLISIS DE OCRATOXINA A EN ALIMENTOS	13
1.2.1. Métodos cromatográficos	13
1.2.2. Métodos inmunoquímicos	15
1.3. DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS	16
1.3.1. Síntesis de haptenos.....	17
1.3.1.1 Herramientas para el diseño racional de haptenos	19
1.3.2 Preparación de conjugados proteicos.....	20
1.3.2.1 Alternativas de conjugación: cicloadición azida–alquino catalizada por cobre (CuAAC)	22
1.3.3 Generación de anticuerpos específicos	25
1.3.3.1 Estructura de las inmunoglobulinas.....	27
1.3.3.2 Tipos de anticuerpos según su modo de generación.....	29
1.3.3.3 Producción de anticuerpo monoclonales.....	30
1.3.4 Caracterización de anticuerpos y diseño del inmunoensayo.....	33
1.3.4.1 ELISA competitivo y sus formatos	33
1.3.4.2 LFIA. Tiras inmunorreactivas	39
1.3.5 Optimización de la sensibilidad: uso de haptenos heterólogos.....	41
1.3.6 Desarrollo del inmunoensayo	43
1.3.7 Antecedentes inmunoquímicos de ocratoxina A	43
2. OBJETIVOS	47
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
3.1 DISEÑO DE HAPTENOS	51
3.1.1 Diseño y análisis retrosintético de haptenos para ocratoxina A.....	52
3.1.1.1 Síntesis de ocratoxina α	54

3.1.1.2 Síntesis del hapteno b	56
3.1.1.3 Síntesis del hapteno f	60
3.1.1.4 Síntesis del hapteno e	62
3.1.1.5 Síntesis del hapteno d	63
3.1.1.6 Síntesis del hapteno a	67
3.1.1.7 Síntesis del hapteno c.....	71
3.1.2 Haptenos sintetizados: Esquema general	73
3.2 PREPARACIÓN DE CONJUGADOS PROTEÍNA–HAPTENO	74
3.2.1 Conjugación de haptenos basados en grupo carboxilo.....	74
3.2.2 Conjugación de haptenos basados en grupo azida	77
3.3 GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	80
3.3.1 Generación de anticuerpos policlonales	80
3.3.2 Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales	81
3.3.2.1 Evaluación de la posición de conjugación sobre la respuesta inmune	81
3.3.2.2 Evaluación de conjugados obtenidos por CuAAC en la respuesta inmune.....	86
3.4 GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	88
3.4.1 Producción de anticuerpos.....	88
3.4.2 Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales.....	91
3.4.2.1 Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa	91
3.4.2.2 Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta	96
3.4.3 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales.....	98
3.5 OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS ELISA	99
3.5.1 Selección de inmunoensayos	99
3.5.1.1 Optimización del pH y de la fuerza iónica	100
3.5.1.2 Influencia de disolventes orgánicos	103
3.5.2 Aplicación de los inmunoensayos	104
3.5.2.1 Estudio del efecto matriz	104
3.5.2.2 Selección y optimización del ensayo final	108
3.5.2.3 Análisis de muestras fortificadas.....	109
3.6 DESARROLLO DE TIRAS INMUNORREACTIVAS	111
3.6.1 Selección de inmunorreactivos	112
3.6.1.1 Optimización del pH y de la fuerza iónica	116
3.6.2 Análisis de muestras fortificadas.....	118
3.6.3 Validación de tiras inmunorreactivas: Regulación (UE) 519/2014.....	119

3.6.3.1 Validación del método ELISA según la Regulación (UE) 519/2014	122
3.7 EVALUACIÓN DE KITS ELISA Y LFIA COMERCIALES	123
3.7.1 Evaluación de kits ELISA	124
3.7.2 Evaluación de tiras inmunorreactivas	125
4. CONCLUSIONES	128
5. EXPERIMENTAL PROCEDURES	133
5.1 Reagents, instruments and techniques	133
5.1.1 Hapten synthesis	133
5.1.2 Buffers and solutions.....	134
5.1.3 Conjugates preparation.....	134
5.1.4 Antibody production and cell culture	135
5.1.5 Immunoassays.....	136
5.2 Hapten synthesis	137
5.2.1 Synthesis of ochratoxin α	137
5.2.2 Synthesis of hapten b	139
5.2.3 Synthesis of hapten f.....	145
5.2.4 Synthesis of hapten e	146
5.2.5 Synthesis of hapten d	149
5.2.6 Synthesis of hapten a	154
5.2.7 Synthesis of hapten c	158
5.2.8 Synthesis of spacer arms	160
5.3 Preparation of protein–hapten conjugates.....	163
5.3.1 Conjugation of carboxylate-based haptens	163
5.3.2 Conjugation of azide-based haptens.....	164
5.3.2.1 Preparation of alkyne-modified proteins.....	164
5.3.2.2 CuAAC reaction.....	164
5.3.3 Storage and conjugate characterization	165
5.4 Generation of polyclonal antibodies	166
5.5 Generation of monoclonal antibodies	166
5.5.1 Immunization of mice.....	166
5.5.2 Hybridoma generation	167
5.5.3 Monoclonal antibody production	168
5.6 Preparation of LFIA components.....	169
5.6.1 Preparation of gold nanoparticles conjugates	169

5.6.2 Preparation of immunostrips	169
5.7 Competitive immunoassays	169
5.7.1 Competitive ELISA	169
5.7.2 Competitive immunostrip	170
5.7.3 Signal processing	170
5.8 Optimization of immunoassays.....	171
5.8.1 pH and ionic strength optimization.....	171
5.8.2 Evaluation of matrix effects	172
5.8.3 Procedure of final developed assays.....	172
5.9 Recovery studies	172
5.10 Validation of assays.....	173
5.11 Evaluation of commercial OTA kits	173
5.11.1 Evaluation of ELISA kits	174
5.11.2 Evaluation of the LFIA kit.....	175
6. REFERENCES	176
ANNEXES	189
A. Hapten synthesis and NMR spectra	A
B. MALDI-TOF spectra	LL
C. ELISA data.....	QQ
D. Immunostrip scheme	RR
E. OTA commercial kits characteristics	SS
F. Patent and publications	TT

ABREVIATURAS

A ₀	Absorbancia en ausencia de analito
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
Ag–Ab	Complejo antígeno–anticuerpo
A _{max}	Absorbancia máxima de ensayo
A _{min}	Absorbancia mínima de ensayo
BSA	Seroalbúmina bovina
CALB	Lipasa acrílica de <i>Candida antarctica</i>
CE	Comisión Europea
CuAAC	Cicloaddición azida–alquino catalizada por cobre (I)
dc	ELISA competitivo directo
dppf	1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FTIA	Inmunoensayo de flujo a través de membrana
GAM	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón
GAR	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo
HAT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina
HATU	Hexafluorofosfato de 3-óxido-(1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio)
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)etano-1-sulfónico
HFCS	Suplemento de fusión y clonaje para hibridomas
HPLC	Cromatografía líquida de elevada eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina y timidina
I	Fuerza iónica
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
ic	ELISA competitivo indirecto
IC _{20,50,80,90}	Concentración de analito que reduce en un 80, 50, 20 o 10% la señal máxima
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Intercambio de grupo funcional
LC	Línea control
LDA	Diisopropilamiduro de litio
LFIA	Inmunoensayo de flujo lateral
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LT	Línea test
LT/LC	Relación de señal de línea test y línea control
m/z	Relación masa/carga
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI	Desorción-ionización láser asistida por matriz
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MIP	Polímero de impresión molecular

Mw	Peso molecular
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
NP	Nanopartícula
NP@mAb	Conjugado nanopartícula–anticuerpo monoclonal
OD	Densidad óptica
OPD	<i>o</i> -Fenilendiamina
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
OT α	Ocratoxina α
OT β	Ocratoxina β
OVA	Ovoalbúmina
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Tampón fosfato salino
PCMC	<i>para</i> -Cloro- <i>meta</i> -cresol
PEG	Polietilenglicol
Phe	<i>L</i> -Fenilalanina
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
PVPP	Poli(vinilpirrolidona)
R	Coefficiente de recuperación
rAb	Anticuerpo recombinante
RAM	Anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón
rAs	Antisuero de conejo
RC	Reactividad cruzada
RGB	<i>Red, Green, Blue</i>
RM	Relación molar hapteno/proteína
RMN	Resonancia magnética nuclear
SPR	Resonancia de plasmones superficiales
STC	<i>Screening Target Concentration</i>
THPTA	Tris(3-hidroxiopropiltriazolilmetil)amina
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
TOF	Detector de tiempo de vuelo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UE	Unión Europea
vLOD	Límite de detección visual

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la encuesta del Eurobarómetro publicada en 2010,¹ la seguridad alimentaria es una de las principales preocupaciones del consumidor, siendo la contaminación química la causa que más intranquilidad produce en la población, por encima incluso de los microorganismos patógenos.

Las biotoxinas, estructuras de origen natural, son uno de los principales compuestos tóxicos que pueden estar presentes en alimentos y que pueden aparecer durante su producción, transporte o almacenamiento.² En función del organismo productor, las biotoxinas se pueden dividir en: fitotoxinas (plantas), zootoxinas (animales), cianotoxinas (bacterias) o micotoxinas (hongos). Estas últimas son uno de los principales desafíos agroalimentarios actuales, ya que representan un serio problema para la salud humana y el bienestar animal, además de ocasionar importantes pérdidas económicas.^{3,4}

Las micotoxinas (del griego *mykes*, hongo, y del latín *toxicum*, veneno) son metabolitos secundarios producidos por organismos del reino *Fungi*, el cual incluye hongos, levaduras y organismos productores de setas. Entre los principales hongos productores de micotoxinas se encuentran los pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Claviceps*. La mayoría son moléculas pequeñas con estructuras muy variadas que no tienen un papel directo en el crecimiento del hongo, sino que su principal función es la de protección, competición o interacción con otras especies. Ciertas micotoxinas pueden ser producidas por varias especies de hongos, y una especie concreta puede ser productora de varias micotoxinas. Además, casi cualquier sustrato vegetal permite el crecimiento fúngico, facilitando que los hongos

micotoxigénicos se extiendan por todo el mundo, si bien su crecimiento se ve favorecido en climas cálidos.⁵

La alta probabilidad de exposición directa, a través de la ingesta de productos vegetales infectados, o indirecta, a través del consumo de carne de animales que han sido alimentados con piensos contaminados, hace necesaria una regulación para garantizar la calidad y seguridad alimentaria del producto que llega al consumidor. Actualmente, el contenido máximo permitido de algunas micotoxinas (Figura 1.1) en los alimentos que más contribuyen a la exposición a nivel europeo se recogen en el Reglamento 1881/2006, del 19 de diciembre de 2006.⁶

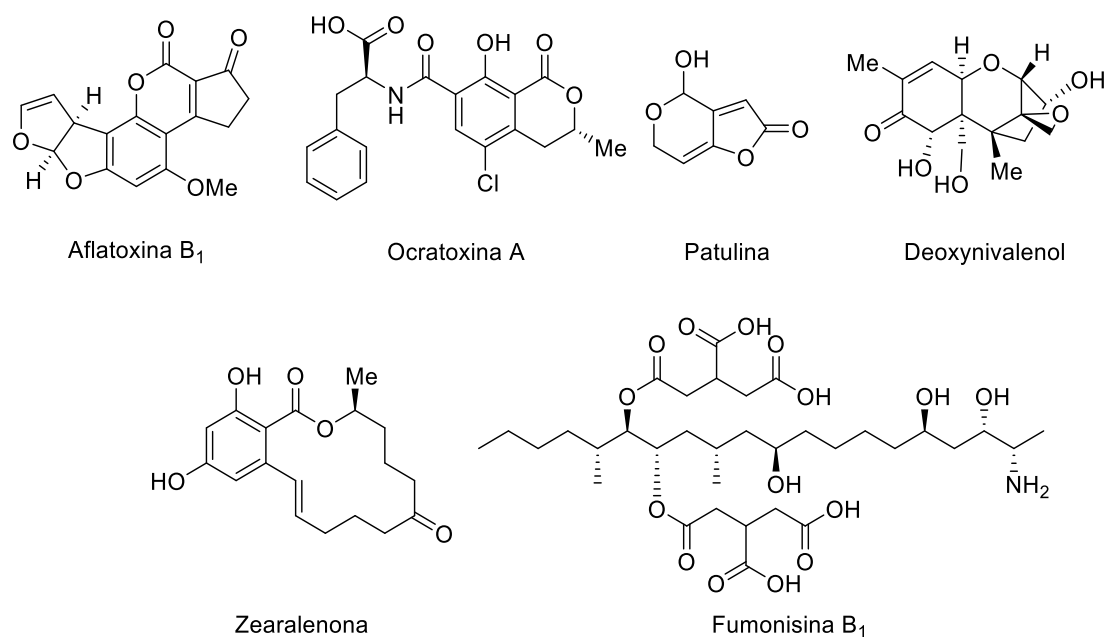


Figura 1.1. Estructura de las micotoxinas reguladas por el Reglamento 1881/2006 de la UE.

Debido a su gran variedad, sus efectos tóxicos y modos de acción son muy diversos, desde las que afectan al sistema inmunitario, pasando por las que actúan sobre el metabolismo de lípidos y glúcidos, hasta las que afectan directamente a determinados órganos como el hígado, riñón, estómago o intestinos.⁷

Históricamente, las primeras intoxicaciones conocidas por exposición a micotoxinas se pueden fechar en la Edad Media, donde eran frecuentes epidemias de alucinaciones, convulsiones y delirios, hechos que fueron atribuidos posteriormente a los alcaloides del cornezuelo del centeno (metabolitos secundarios del hongo *Claviceps purpurea*). Incluso se ha sugerido que episodios históricos bien conocidos como las brujas de Salem podrían tener su origen en la ingesta de micotoxinas. Un ejemplo más reciente de intoxicación es el sufrido en 1960 en Reino Unido, donde se produjo la muerte de pavos y patos por contaminación de harinas por aflatoxinas.

1.1. OCRATOXINA A

La ocratoxina A (ácido (2*S*)-2-[[[(3*R*)-5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-3,4-dihidroisocromeno-7-carbonil]amino]-3-fenilpropanoico), comúnmente abreviada en la literatura como OTA, es el miembro principal de la familia de las ocratoxinas, donde también se incluyen la ocratoxina B (OTB) y la ocratoxina C (OTC) (Figura 1.2),^{8,9} si bien OTA es la más prevalente y tóxica (ver sección 1.1.3). Estas micotoxinas son producidas principalmente por hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (ver sección 1.1.1). De hecho, la OTA fue aislada por primera vez en 1965 por K. Van der Merwe a partir del hongo *Aspergillus ochraceus*, al que debe su nombre.⁸ Las tres estructuras que comprenden esta familia presentan el mismo esqueleto hidrocarbonado, formado por un fragmento de *L*-fenilalanina (Phe) unido a través de un enlace amida a un fragmento de dihidroisocumarina, comúnmente conocido como ocratoxina α (OT α). Tal y como se muestra en la Figura 1.2, la diferencia estructural entre OTA y OTB se encuentra en la ausencia del átomo de cloro en el C-5' del anillo de dihidroisocumarina de OTB. En cambio, la diferencia entre OTA y OTC se centra en el fragmento de Phe, siendo OTC el éster etílico de OTA.

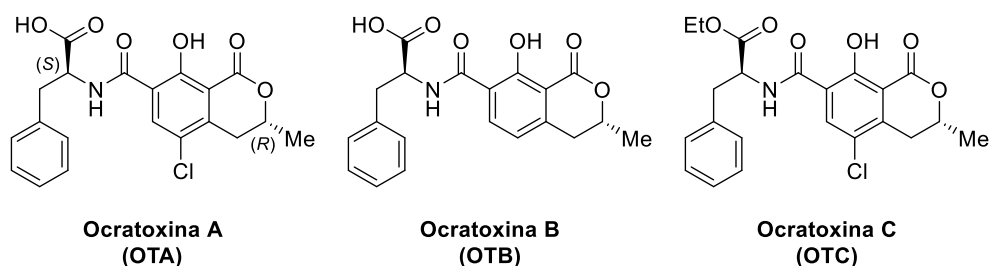


Figura 1.2. Estructura de las diferentes ocratoxinas.

La primera vez que se describió la presencia de OTA en alimentos fue en maíz en 1969.¹⁰ Desde entonces, se han descrito más de 90 alimentos que contribuyen a la exposición de OTA a través de la dieta. Una cifra reveladora en cuanto a la alta incidencia de esta micotoxina viene reflejada en el número de casos de alerta a través del *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) de la Unión Europea (UE). Como ejemplo, en la Tabla 1.1 se muestran las alertas por presencia de OTA en alimentos durante el año 2019.

Tabla 1.1. Alertas emitidas por RASFF producidas a lo largo del año 2019 por la presencia de OTA en alimentos.

Alimento	País de Origen	Nº Notificaciones	OTA (ng/g)
Cacahuetes	India	1	25
Pistachos	Turquía	1	27
	Estados Unidos	4	30 - 93
	Alemania	1	67
	Desconocido	1	96
Zumo de uva	Estonia	1	3
Fruta orgánica	Reino Unido	1	2
Higos secos	Turquía	7	13 - 189
	Uzbekistán	6	16 - 67
	China	4	15 - 22
	Turquía	31	12 - 180
Pasas	República Checa	1	20
	India	1	30
	Irán	1	23
	Pakistán	1	25
Pimentón	España	2	31
Chile en polvo	Sri Lanka	2	63 - 106
	Reino Unido	1	31
Nuez moscada	Indonesia	1	68
Mezcla de especias	Francia	1	27
Plantas aromáticas	Croacia	1	478
Regaliz	Azerbaiyán	1	107
Harina de cebada	Reino Unido	1	16
Centeno	Polonia	2	7
	Alemania	1	4
	República Checa	1	6
Soja	India	1	44
Pasta de maíz	Rumanía	1	8
Arroz	India	1	14

1.1.1. Biosíntesis de ocratoxina A

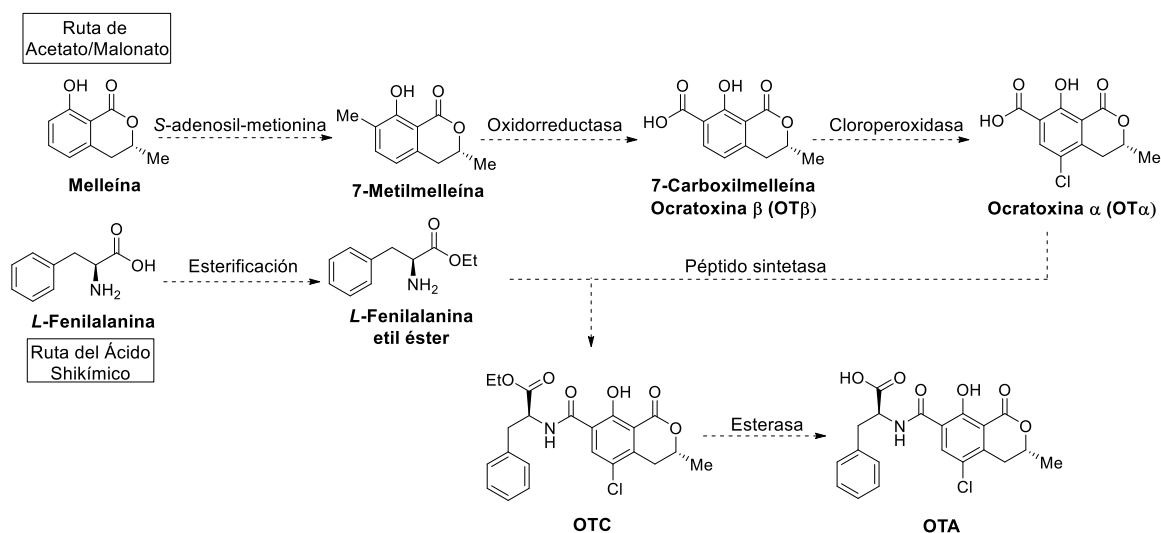
Como se ha señalado previamente, los principales géneros de hongos productores de OTA son *Aspergillus* y *Penicillium*, siendo varias las especies capaces de producir esta micotoxina. *A. ochraceus* suele considerarse el principal productor en climas cálidos, mientras que la especie dominante en zonas más frías es *P. verrucosum*.¹¹ Desde que Van der Merwe aislara por primera vez OTA de *A. ochraceus*, varios autores han contribuido a esta área añadiendo varias especies productoras al género *Aspergillus*.¹²⁻¹⁴ Dentro del género *Penicillium*, la variedad es considerablemente menor, limitándose únicamente a *P. verrucosum*, *P. nordicum* y *P. thymicola*.^{15,16} En la Tabla 1.2 se recogen las principales especies de hongos productores de OTA.

Tabla 1.2. Principales especies productoras de OTA de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

Género <i>Aspergillus</i>			Género <i>Penicillium</i>
<i>A. affinis</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. roseoglobulosus</i>	<i>P. nordicum</i>
<i>A. albertensis</i>	<i>A. lacticoffeatus</i>	<i>A. sclerotioniger</i>	<i>P. verrucosum</i>
<i>A. alliaceus</i>	<i>A. muricatus</i>	<i>A. sclerotiorum</i>	<i>P. thymicola</i>
<i>A. auricomus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. steynii</i>	
<i>A. carbonarius</i>	<i>A. occultus</i>	<i>A. sulphureus</i>	
<i>A. cretensis</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. versicolor</i>	
<i>A. flocculosus</i>	<i>A. pseudoelegans</i>	<i>A. welwitschiae</i>	
<i>A. fresenii</i>	<i>A. pulvericola</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	

Si bien la ruta biosintética de las ocratoxinas no ha sido completamente descrita, ciertas etapas parecen estar claras. Así, la biosíntesis del fragmento de dihidroisocumarina se produce a través de la ruta de los policétidos, la unión de este fragmento a Phe (procedente de la ruta del ácido shikímico) la realiza una péptido sintetasa; y la etapa de cloración es llevada a cabo por una halogenasa.

En la ruta biosintética inicialmente propuesta en 1979 por Huff y Hamilton,¹⁷ el policétido melleína es sintetizado a través de la ruta del acetato/malonato. Este es transformado en ocratoxina β (OT β) gracias al agente alquilante S-adenosil-metionina y a una oxidorreductasa. Tras la acción de una cloroperoxidasa, se obtendría la estructura de OT α . Por último, tras el acoplamiento con el éster etílico de la Phe vía una péptido sintetasa, se obtendría el esqueleto completo de OTC, que tras hidrólisis daría lugar a OTA (Figura 1.3).

**Figura 1.3.** Ruta biosintética de OTA propuesta por Huff y Hamilton en 1979.¹⁷

Harris y Mantle proponen una vía alternativa basándose en un estudio del genoma de *A. ochraceus* y en un estudio de precursores, en el que prueban que la melleína marcada con ^{14}C no se incorpora en la estructura final de ninguna de las ocratoxinas.¹⁸ En esta vía, sería OT β quien

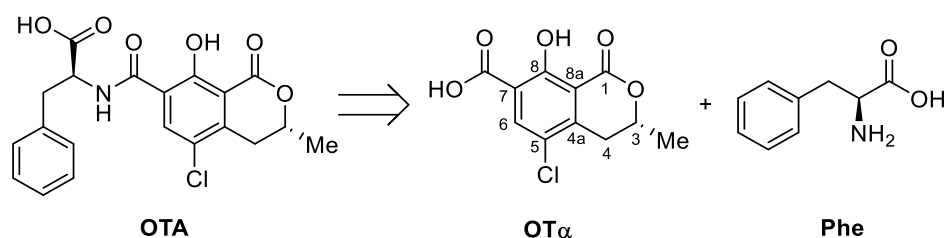
daría lugar a OTB tras el acoplamiento con Phe, que por la acción de una halogenasa daría lugar a OTA, explicando la existencia de OT α como un producto de hidrólisis de OTA.^{19,20}

El género *Aspergillus* es capaz de producir de forma paralela OTA y OTB; en general, la cantidad de OTB producida es considerablemente menor a la de OTA, aunque bajo ciertas condiciones de cultivo ambas cantidades pueden ser equiparables.^{18,21} Experimentos llevados a cabo por Harris y Mantle con *A. ochraceus* muestran que el metabolito OT β es transformado eficientemente en OTA y OTB, mientras que OT α es únicamente transformado en OTA, resultado que apoya la ruta propuesta por estos autores.

En definitiva, a pesar de que las reacciones clave han sido ampliamente estudiadas, la gran variedad de hongos productores, junto a la influencia de las condiciones de cultivo, ha dificultado hasta la fecha la resolución completa de la ruta biosintética de esta micotoxina.^{22,23}

1.1.2. Síntesis química de ocratoxina A

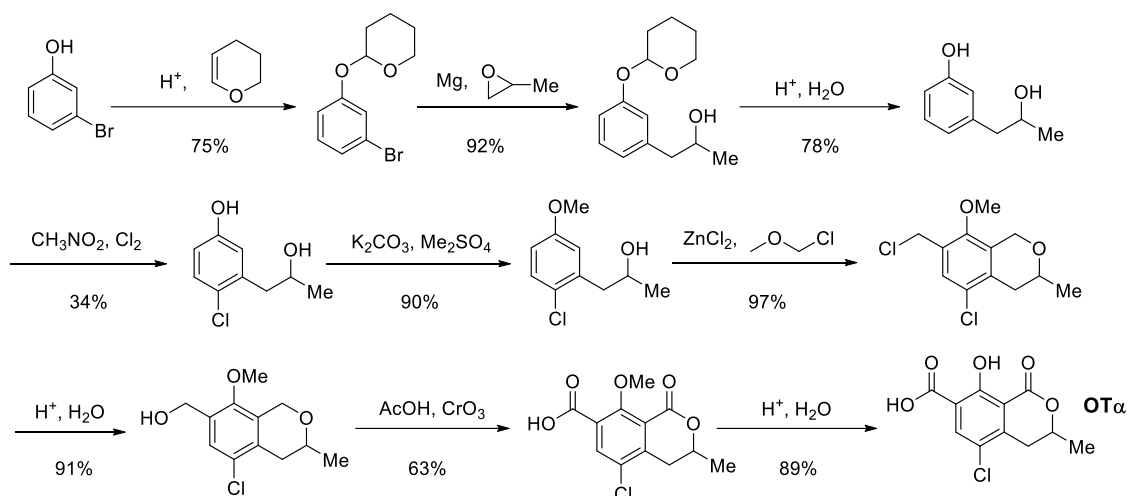
El trabajo sintético desarrollado hacia la síntesis de OTA es relativamente amplio, siendo varios los autores que han descrito la síntesis total de esta micotoxina a través de distintas aproximaciones. Todas las estrategias descritas convergen en un intermedio común, el fragmento de dihidroisocumarina OT α , siendo la preparación de este el principal reto sintético. La construcción del esqueleto completo de OTA a partir de OT α se realiza mediante una reacción de condensación con Phe (Esquema 1.1), tal y como ocurre en la ruta biosintética natural. A continuación, se analizarán las principales estrategias sintéticas descritas hasta la fecha para la preparación de OT α , dejando de lado la formación del enlace amida entre esta y el aminoácido Phe por tratarse de una reacción sencilla y ampliamente conocida.



Esquema 1.1. Retrosíntesis simplificada de OTA.

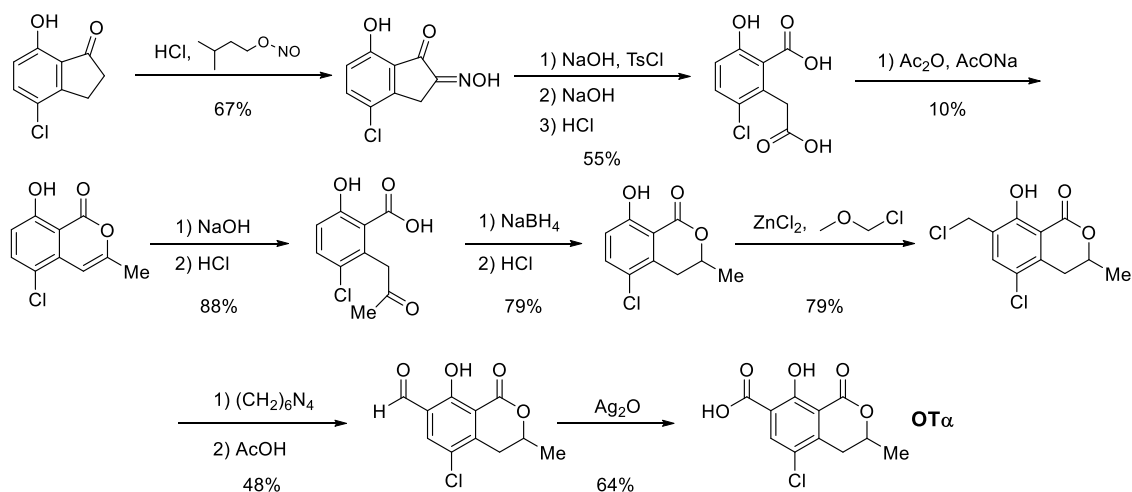
La primera síntesis racémica de OT α fue descrita en 1967 por Steyn y Holzapfel, solo dos años después del aislamiento de OTA. Esta primera síntesis (Esquema 1.2) comprendía un total de 8 etapas y empleaba 3-bromofenol como producto de partida.²⁴ Tras introducir la cadena alquímica que dará lugar al anillo de lactona tras ciclación con clorometiléter y cloruro de zinc como catalizador, se obtiene la estructura bicíclica base de OT α . Finalmente, tras hidrólisis y oxidación

en medio ácido con óxido de cromo, se obtiene su estructura final con un rendimiento global del 8%.



Esquema 1.2. Primera síntesis de OT α descrita por Steyn y Holzapfel en 1967.²⁴

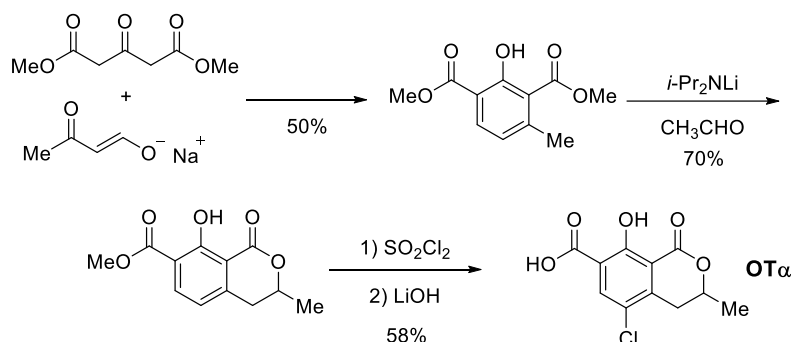
Solo tres años después, Roberts y Woollven describieron una aproximación completamente distinta (Esquema 1.3) para la síntesis de OT α que comprende 9 etapas con un rendimiento global del 0.6%.²⁵ Esta síntesis parte de 4-cloro-7-hidroxiindanona, a partir de la que se obtiene la estructura bicíclica de dihidroisocumarina tras varias aperturas y cierres del anillo no aromático. Tras una reacción similar a la empleada por Steyn y Holzapfel, se introduce un grupo clorometilo en posición 7, que tras su oxidación da lugar a OT α racémica.



Esquema 1.3. Síntesis de OT α descrita en 1970 por Roberts y Woollven.²⁵

La primera aproximación sintética a OT α en la que el anillo aromático se prepara *de novo* es la descrita por Kraus en 1981.²⁶ Esta ruta, con solo 3 etapas y con un rendimiento global del 20% (Esquema 1.4), resulta mucho más eficaz que las dos síntesis previamente descritas. El anillo aromático se prepara empleando 3-oxopentanodicarboxilato de metilo y la sal sódica de hidroximetilacetona. Una vez obtenido este anillo aromático, la generación del carbanión

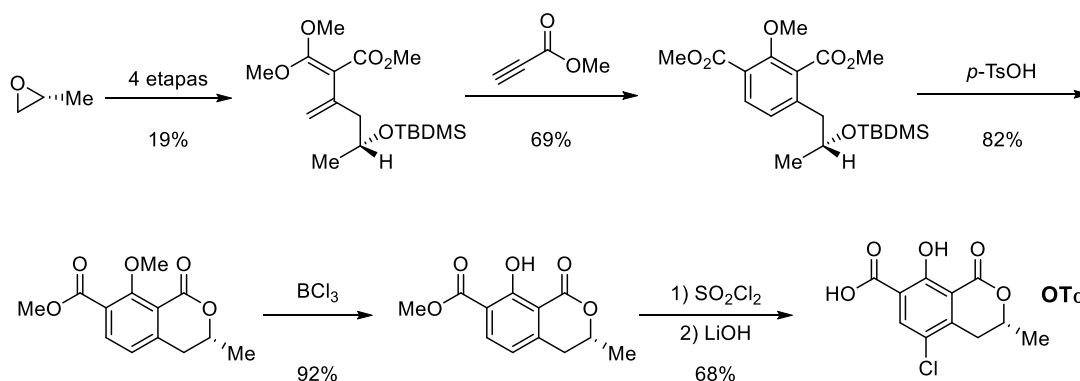
bencílico con diisopropilamido de litio y su posterior adición a acetaldehído da lugar a la estructura bicíclica de dihidroisocumarina. Tras cloración e hidrólisis básica de esta, se obtiene OT α en forma racémica. Años después, varios autores reprodujeron esta síntesis sustituyendo la sal sódica de hidroximetilacetona por diferentes electrófilos, obteniendo OT α con rendimientos similares a los descritos por Kraus.²⁷⁻²⁹



Esquema 1.4. Síntesis de OT α descrita en 1981 por Kraus.²⁶

Otro ejemplo de síntesis de OT α racémica es la descrita en 1985 por Sibi y colaboradores. Esta síntesis parte de *O*-4-clorofenildietilcarbamato para obtener, tras solo cinco etapas, OT α con un rendimiento global del 6%.³⁰ Esta ruta sintética se basa en la metalación de las posiciones *orto* al grupo carbamato para así introducir los grupos carbonilo. El cierre del anillo de lactona es llevado a cabo empleando bromuro de alilo a través de reacciones similares a las descritas en las síntesis previas.

La primera síntesis enantioselectiva de OT α fue descrita en 2002 por Donner y Gill (Esquema 1.5).³¹ Para introducir la configuración deseada en el C-3' del esqueleto de dihidroisocumarina, parten de óxido de metileno enantoméricamente puro, que se utiliza para preparar el dieno que reacciona, vía una reacción de Diels-Alder, con propiolato de metilo para generar el anillo aromático del esqueleto de OT α . Al igual que en ejemplos anteriores, el tratamiento ácido catalítico permite el cierre del anillo de lactona, el cual tras cloración y desmetilación da lugar a OT α con un rendimiento global del 7%. En 2013, Lenz y Rychlik también emplearon este mismo oxirano para obtener OT α enantioméricamente pura empleando una aproximación similar a la previamente descrita por Steyn y Holzapfel con un rendimiento del 15%.³² Más recientemente, en 2017, Glorius y colaboradores emplearon un organocatalizador basado en rutenio para llevar a cabo la hidrogenación asimétrica del intermedio de isocromen-1-ona descrito por el grupo de Roberts y Woollven, obteniendo de este modo OT α en forma enantioméricamente pura.³³



Esquema 1.5. Primera síntesis enantioselectiva de OT α , descrita en 2002 por Donner y Gill.³¹

En definitiva, son muchas las aproximaciones descritas para la obtención, tanto de forma racémica como enantioméricamente pura, de OT α . No obstante, debido al gran número de etapas sintéticas que son necesarias en la mayoría de ellas, los rendimientos globales son considerablemente bajos.

1.1.3. Toxicidad y metabolismo de ocratoxina A

OTA es un fuerte carcinógeno en ratones, lo que hizo que fuese clasificada en 1993 en el grupo 2B (posible carcinógeno en humanos) por la IARC. Se han publicado varios trabajos en los que se le atribuye carácter nefrotóxico, hepatotóxico, teratogénico, inmunotóxico y carcinogénico en varias especies.^{34,35} Además de los efectos citotóxicos directamente asociados con la inhibición y activación de enzimas relacionadas con la síntesis de proteínas,³⁶⁻³⁸ su toxicidad se asocia también con la reducción de actividad de órganos implicados en la respuesta inmunológica.^{39,40} La dosis letal (LD₅₀) de OTA en ratones es de 48-58 mg/kg, de 1-6 mg/kg para cerdos y de 20-30 mg/kg para ratas.³⁴ La principal sintomatología que se observa tras la intoxicación es pérdida de peso, poliuria, polidipsia y hemorragias en los principales órganos metabólicos.

El mecanismo por el que OTA resulta tóxica no está del todo claro. Estudios *in vivo* donde su toxicidad es comparada con análogos en los que el aminoácido Phe ha sido sustituido por aminoácidos no relacionados muestran un descenso de la toxicidad.^{36,41} Rottkord y colaboradores demostraron que no solo es importante la presencia de este aminoácido, sino también su configuración. Cuando a un grupo de ratones se les administraba una dosis de OTA de 50 mg/kg, se obtuvo un 90% de muertes a las 72 h de la administración, mientras que cuando se les aplicaba una dosis de hasta 200 mg/Kg de *D*-fenilalanina-OTA todos los animales sobrevivieron.⁴² En lo referido al fragmento de dihidroisocumarina, la sustitución del átomo de cloro por bromo no parece tener ningún efecto sobre la toxicidad de esta micotoxina, mientras que cuando es sustituido por flúor o yodo su toxicidad disminuye en células epiteliales de riñón humano.

Asimismo, el cambio de configuración del C-3' o la apertura del anillo de lactona conllevan también una disminución de su toxicidad.⁴¹

Las publicaciones sobre la toxicidad del resto de ocratoxinas son relativamente escasas. Estudios *in vivo* muestran una toxicidad mucho menor de OTB en ratas, peces y aves (un estudio comparativo con pollos de un día de edad muestra una LD₅₀ de 3.5 mg/kg para OTA y de 54 mg/kg para OTB).^{43,44} Se obtuvieron resultados similares en estudios *in vitro* en los que se testó la capacidad nefrotóxica, hepatotóxica o inmunotóxica de OTB en comparación con OTA.^{45,46} En el caso de OTC, estudios con células HeLa S3 han mostrado una concentración letal (LC₅₀) muy similar para OTA y OTC, con valores de 5 μM y 9 μM, respectivamente.⁴² Por último, OTα es aproximadamente 100 veces menos tóxica que OTA.⁴²

En lo referido a su metabolismo, en la mayoría de las especies estudiadas, OTA se absorbe de manera rápida en el estómago gracias a sus condiciones ácidas. Aproximadamente el 50% de la cantidad ingerida es absorbida, la cual se distribuye a través de la sangre a los principales órganos diana, fundamentalmente a los riñones y, en menor grado, al hígado.^{47,48} Además de OTA, también se distribuyen sus principales metabolitos no tóxicos, tales como OTα y otros de presencia minoritaria (Figura 1.4). La fracción no absorbida es metabolizada por la población microbiana del intestino para dar OTα y Phe, especies no tóxicas.⁴⁹

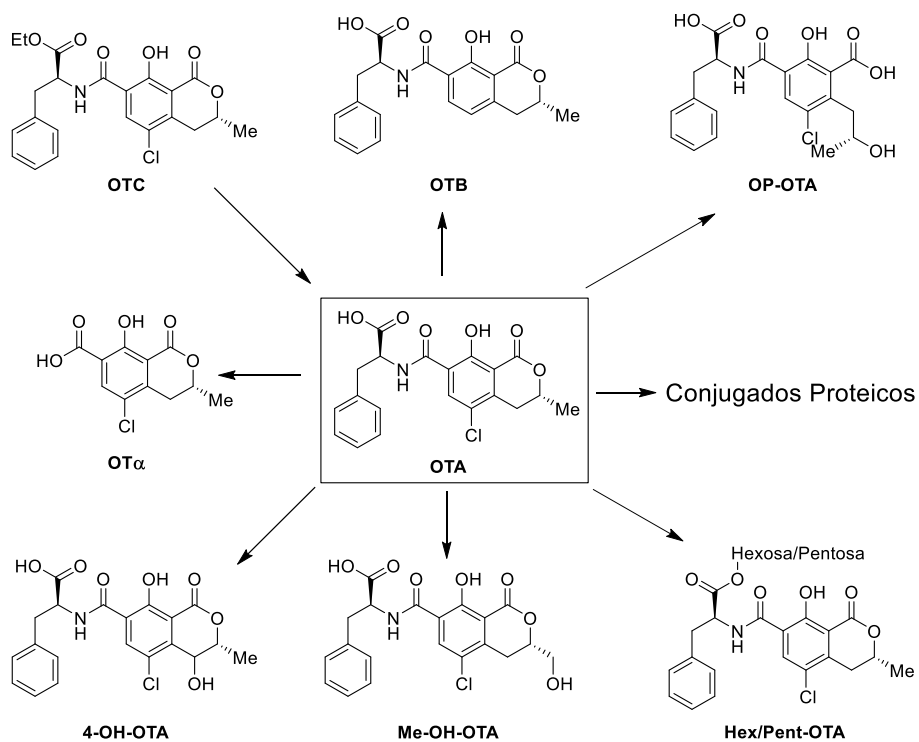


Figura 1.4. Principales metabolitos de OTA.

En lo referente a su eliminación, la vía principal parece implicar la unión a proteínas y la posterior excreción renal.⁵⁰ Asimismo, se han observado niveles altos de OTA en las secreciones

lácteas. No obstante, en el caso de los rumiantes es degradada por la acción de la microflora del rumen, por lo que no se excreta a través de la leche.⁵¹

En 1991, el comité mixto FAO/WHO [unión de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO)] estableció la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI, *provisional tolerable weekly intake*) en 112 ng/kg basándose en estudios de deterioro de la función renal en cerdos.⁵² Esta cifra ha sido revisada en varias ocasiones, la más reciente en 2008, donde se redujo a 100 ng/kg a raíz de nuevos datos sobre su toxicidad. Actualmente, el comité mixto FAO/WHO estima la exposición a OTA a través de cereales, basada en datos europeos, en 8-17 ng/kg por semana, muy por debajo de la PTWI.

1.1.4. Marco legal

La presencia de OTA en alimentos está sujeta a regulación a nivel nacional e internacional. Aunque sus efectos tóxicos comenzaron a ser evidentes a finales de los años 70, no fue hasta los años 90 cuando se planteó la regulación de su presencia en alimentos.

En la UE, los primeros límites en alimentos se establecieron en marzo de 2001 en el Reglamento No 466/2001⁵³ de la Comisión Europea (CE), que un año más tarde fue modificado por el Reglamento No 472/2002.⁵⁴ Debido a las continuas modificaciones del Reglamento No 466/2001, este fue reemplazado por el Reglamento No 1881/2006 del 19 de diciembre de 2006, donde se establecen los límites máximos en varios tipos de alimentos (Tabla 1.3).⁶ Este reglamento, vinculante para los 27 Estados Miembros de la UE, sigue vigente a día de hoy a pesar de que también ha sufrido varias modificaciones. Además de establecer límites máximos de OTA en productos agroalimentarios, desde 2002 la UE ha unificado los métodos de muestreo y análisis de esta micotoxina.⁵⁵

A nivel mundial, el Comité Mixto FAO/WHO marca un límite máximo de 5 µg/kg en trigo, cebada y centeno.⁵⁶ Además, entre 2003 y 2014, también se establecieron códigos de buenas prácticas con el objetivo de reducir la presencia de OTA en cereales, vino, café y cacao.⁵⁷⁻⁶⁰ Países como Suiza, Brasil, China o Japón fijan límites similares a los existentes en la UE. Por el contrario, Estados Unidos no tiene una legislación específica al respecto y se ha centrado en el desarrollo de buenas prácticas para minimizar la exposición de su población a esta micotoxina.⁶¹

Tabla 1.3. Límites máximos establecidos por la CE en el Reglamento No 1881/2006 para OTA en diversos alimentos.

Producto	Contenido Máximo ^a
Cereales no elaborados	5
Productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo	3
Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10
Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5
Café soluble (café instantáneo)	10
Vino (incluidos vinos espumosos y excluidos vinos de licor y vinos con un grado alcohólico mínimo de 15% vol.) y vino de frutas	2
Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2
Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo	2
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0.5
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0.5
<i>Piper spp.</i> (frutos de dicho género, incluidas pimienta blanca y negra), <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada), <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) y <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma)	15
<i>Capsicum spp.</i> (frutos de dicho género desecados, enteros o pulverizados, incluidos los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón)	20
Mezclas de especias que contengan una de las especias anteriores	15
Regaliz (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> y otras especies)	-
Raíz de regaliz, ingrediente para infusiones	20
Extracto de regaliz, para uso alimentario, especialmente en bebidas y confitería	80
Gluten de trigo no destinado a la venta directa al consumidor	8

^a Concentración expresada en µg/kg.

1.1.5. Incidencia en alimentos

La mayoría de los productos que se muestran en la Tabla 1.3 se pueden incluir básicamente en tres grupos: cereales y derivados, especias y derivados de uva. Como es bien sabido, los dos primeros representan alimentos muy consumidos a nivel mundial. Y en cuanto a los derivados de uva, destaca el vino por ser un producto de elevado valor añadido y con un importante papel cultural que afecta especialmente a países como Francia, Italia y España, los mayores productores a nivel mundial.

El informe del panel de expertos de la EFSA (*European Food Safety Authority*) de 2018, donde se detalla la incidencia de esta micotoxina, proporciona una visión general de su presencia en diversas matrices.⁶² En este informe se recogen más de noventa mil resultados obtenidos entre 2009 y 2018, entre los que cabe destacar la alta incidencia de esta micotoxina en alimentos como

cereales o vino, si bien mayoritariamente por debajo de los límites legales establecidos por la CE. Además, son varias las publicaciones y revisiones donde se muestra la elevada incidencia de OTA en diversos alimentos.⁶³⁻⁶⁵ De entre todos ellos, el vino es uno de los más estudiados.⁶⁶⁻⁶⁹ Esta micotoxina presenta una alta incidencia tanto en vinos tintos como blancos, llegando en algunos de los estudios a estar presente en el 100% de las muestras analizadas,^{66,70} aunque rara vez se describen valores superiores a los permitidos por la UE (2 µg/kg).^{64,71}

1.2. ANÁLISIS DE OCRATOXINA A EN ALIMENTOS

Los restrictivos límites establecidos para la presencia en OTA en alimentos, mayoritariamente por debajo de 10 µg/kg, hacen necesario disponer de métodos analíticos con elevada selectividad y bajos límites de detección que permitan garantizar la inocuidad de los productos que llegan al consumidor.

Para los organismos reguladores, los métodos cromatográficos constituyen la metodología de referencia, siendo la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) la opción más extendida para el caso de OTA. No obstante, los métodos basados en reconocimiento molecular donde se emplean biorreceptores específicos, como son polímeros de impresión molecular (MIPs),⁷²⁻⁷⁴ aptámeros⁷⁵⁻⁷⁷ y fundamentalmente anticuerpos, gozan de un elevado grado de implantación en empresas y laboratorios de control.

1.2.1. **Métodos cromatográficos**

Para analizar los residuos de micotoxinas se recurre habitualmente a técnicas instrumentales, como son la cromatografía de gases o la cromatografía líquida de alta eficacia. Como es bien sabido, estas técnicas permiten la separación de los diferentes compuestos presentes en una muestra, resultando ideales para análisis multiresiduo en laboratorios oficiales. No obstante, las técnicas cromatográficas presentan algunos inconvenientes que las convierten en poco adecuadas para ciertas aplicaciones. Así, a pesar de presentar una gran reproducibilidad, no son las técnicas más aptas cuando se desea llevar a cabo el análisis rápido de un solo analito en un gran conjunto de muestras, ni tampoco cuando la determinación ha de llevarse a cabo *in situ*. Además, se requieren equipos sofisticados de elevado coste, que deben ser manejados por personal cualificado. Desde el punto de vista práctico, y tal como ocurre en el caso de OTA, en muchas situaciones estos métodos requieren de un tratamiento previo de la muestra, que suele incluir una etapa de extracción con disolventes orgánicos y etapas de limpieza y preconcentración, lo que repercute en el tiempo de análisis y en el coste del proceso. Estas limitaciones justifican la

búsqueda de métodos analíticos más rápidos, fáciles de usar, portátiles y económicos, que actúen como complemento de las técnicas instrumentales.

Para el caso de OTA, la técnica recomendada por la UE para su control y cuantificación es la HPLC acoplada a un detector de fluorescencia.⁷⁸ Debido a la complejidad de las matrices, se hace necesaria la limpieza de la muestra y una etapa de preconcentración para alcanzar los límites de detección necesarios. Una de las alternativas más extendidas para lograr ambos propósitos son las columnas de inmunoafinidad (Figura 1.5), basadas en la unión específica antígeno–anticuerpo (Ag–Ab). Buena prueba de la utilidad de esta técnica para el análisis de OTA es que se recomienda, junto a la HPLC acoplada a un detector de fluorescencia, en la Norma Europea EN 14133 para el análisis de vino y cerveza, en la EN 14132 para el análisis de cebada y café y en la EN 15829 para el análisis de pasas y frutos secos. Existe una gran variedad de columnas disponibles comercialmente para la purificación y concentración de OTA, pero en todas ellas el fundamento es el mismo: un soporte sólido en el que ha sido inmovilizado un anticuerpo con alta especificidad hacia esta micotoxina. Tras la adición de la muestra, previamente homogeneizada, OTA es retenida por su interacción específica con el anticuerpo. Tras varios lavados para eliminar los interferentes, se lleva a cabo la elución del analito con un disolvente orgánico. Tras la evaporación del disolvente y la redisolución en la fase móvil del método cromatográfico, la micotoxina se cuantifica mediante fluorescencia. Este método analítico ha sido ampliamente empleado por varios autores para la cuantificación de esta biotoxina en matrices tales como vino, cerveza o cereales.^{63,65,79,80} No obstante, alternativas al método oficial incluyen el uso de columnas basadas en MIPs^{72,81,82} o de extracciones en fase sólida (SPE) con C18, PSA (*primary/secondary amine*) o incluso proteínas.^{83–85} Además, a pesar de que el método recomendado por la CE se basa en la detección por fluorescencia, son muchos los autores que han optado por el uso de la espectrometría de masas, alcanzando límites ligeramente inferiores.^{86–88}

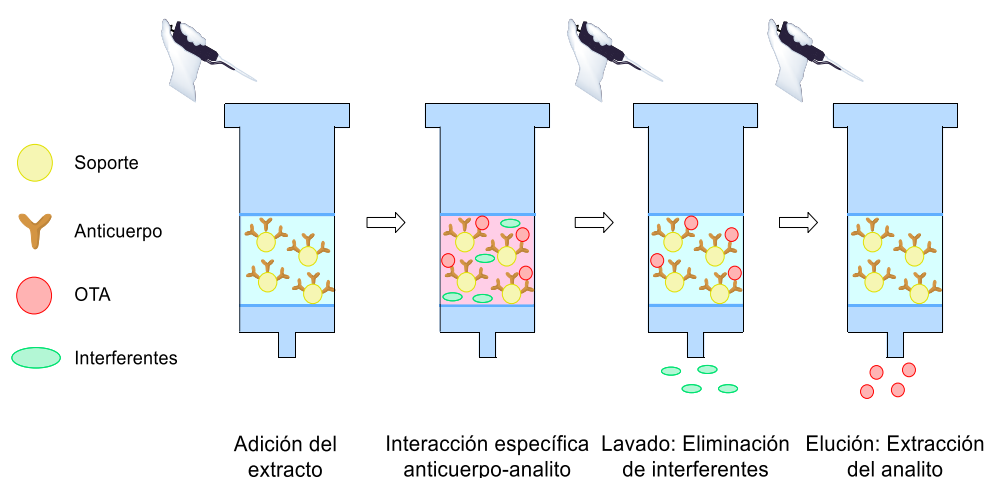


Figura 1.5. Funcionamiento de las columnas de inmunoafinidad para la limpieza y concentración de la muestra.

1.2.2. Métodos inmunoquímicos

Estos métodos desempeñan un papel complementario dado que sus principales virtudes coinciden con las limitaciones de las técnicas instrumentales, *i. e.*, permiten medir muchas muestras simultáneamente en entornos con escasos recursos técnicos y de forma rápida. Este tipo de ensayos se basan en el reconocimiento específico de una molécula por su interacción con un anticuerpo (inmunoglobulinas, Ig) que ha sido previamente generado frente a ella, la ya mencionada reacción antígeno–anticuerpo.

La gran versatilidad de los anticuerpos permite su implementación en una gran variedad de formatos. En este sentido, las microplacas de 96 pocillos son una de las plataformas más empleadas, ya que permiten una gran variedad de sistemas de detección. Entre ellos podemos encontrar la fluorescencia (*Fluoroimmunoassay*, FIA),⁸⁹ la quimioluminiscencia (*Chemiluminescent Immunoassay*, CLIA)⁹⁰ o incluso la radioactividad (*Radioimmunoassay*, RIA).⁹¹ No obstante, los más extendidos son los ensayos colorimétricos, destacando especialmente los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA),⁹² tanto en su formato de anticuerpo inmovilizado (formato directo) como en su formato de conjugado inmovilizado (formato indirecto). Otra de las plataformas comúnmente empleadas son las membranas porosas, que permiten el desarrollo de ensayos de flujo lateral (*Lateral Flow Immunoassay*, LFIA)⁹³ y de flujo a través de membrana (*Flow-Through Immunoassay*, FTIA).⁹⁴ Asimismo, los anticuerpos también pueden ser implementados en las ya mencionadas columnas de inmunoafinidad⁹⁵ o en sistemas basados en resonancia de plasmones superficiales (SPR, *surface plasmon resonance*).⁹⁶

No obstante, de entre toda la variedad de formatos existente, los métodos ELISA y LFIA, junto con las columnas de inmunoafinidad, son los más empleados, existiendo un gran número de empresas de inmunodiagnóstico que ofertan kits específicos para la cuantificación de OTA en diversas matrices (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Ejemplos de kits ELISA y LFIA comercializados para la detección y cuantificación de OTA en diversas matrices.

ELISA			LFIA		
Empresa	Matriz	LOQ ^a	Empresa	Matriz	LOQ
ABRAXIS	Café	2.5	CHARM	Vino	1.0
	Cerveza	0.5		Cereales	-
	Vino	1.8	CUSABIO	Cereales	5.0
	Pienso	5.0	ENVIROLOGIX	Trigo y maíz	1.5
BIO-SHIELD	Cereales y especias	1.5	NANKAI	Vino	10.0
	Cereales, avena y pienso	0.15	BIOTECH CO.	Cerveza	3.0
BIOO SCIENTIFIC	Cacao	0.06	NEOGEN	Cereales	2.0
	Leche	0.15	PROGNOSIS	Cereales y nueces	1.0
	Especias	0.15	ROMER LABS	Trigo	4.0
	Vino tinto	0.15	R-BIOPHARM	Cereales y pienso	1.5
CUSABIO	Café tostado	1.50	VICAM	Trigo y café	2.0
	Suero y orina	0.75			
	Aceites vegetales	0.15			
	Pienso y soja	2.0			
EUROPROXIMA	Vino y cerveza	0.6			
	Cereales y pienso	0.4			
	Cacao	0.8			
	Café	1.0			
FITZGERALD	Soja y pienso	5.0			
HELICA	Vino	2.0			
	Café, cacao y especias	1.0			
NEOGEN	Maíz, cebada, trigo y café	2.0			
ROMER LABS	Cereales, especias y café	2.0			
SIGMA ALDRICH	Cereales y pienso	2.0			
	Café, cacao y especias	2.5			
EUROFINS	Vino y cerveza	2.0			
	Cereales, pienso y cacao	1.0			
TECNA	Vino y uva	0.1			
	Café	0.2			

^a Límite de cuantificación en muestra expresado en ng/mL.

1.3. DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

El desarrollo de métodos inmunoquímicos para la detección de analitos de bajo peso molecular presenta un esquema común bien establecido. La etapa inicial de este proceso es el diseño y síntesis de haptenos, seguido de la preparación de conjugados proteicos y el uso de estos para la generación de anticuerpos. Tras evaluar la afinidad de los anticuerpos mediante ELISA competitivo en diferentes formatos y empleando distintos bioconjugados, se establecen las condiciones óptimas de ensayo para un grupo seleccionado de combinaciones de inmunorreactivos. Por último, se procede a la aplicación del ensayo en matrices reales y su validación analítica. Estas etapas se describen en los siguientes apartados de la memoria.

1.3.1. Síntesis de haptenos

El sistema inmunitario es capaz de desencadenar una respuesta adaptativa frente a agentes extraños de naturaleza proteica, como virus, bacterias o proteínas exógenas. Resulta, por tanto, relativamente sencillo obtener anticuerpos capaces de reconocer a estas estructuras mediante la simple exposición periódica de un animal de laboratorio a cualquiera de ellas. Sin embargo, los compuestos de bajo peso molecular no son capaces de generar por sí mismos una respuesta inmunitaria, pero sí pueden ser reconocidos por anticuerpos, por lo que son antigénicos, pero no inmunogénicos. Karl Landsteiner, uno de los padres de la inmunología moderna, galardonado en 1930 con el premio Nobel de Medicina o Fisiología por el descubrimiento de los grupos sanguíneos, bautizó a estos compuestos con el nombre de haptenos, y la OTA, con un peso molecular de 403.8 g/mol, forma parte de este tipo de analitos.⁹⁷ No obstante, Landsteiner también descubrió que es posible obtener anticuerpos frente a haptenos si estos se unen covalentemente a una entidad mayor, normalmente una proteína (Figura 1.6).

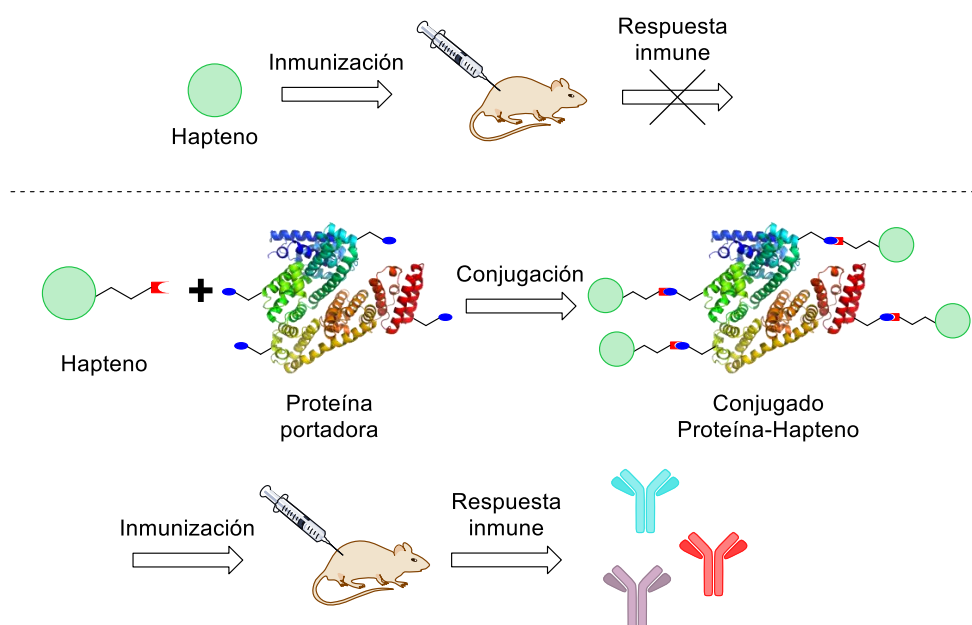


Figura 1.6. Esquema simplificado del proceso de obtención de anticuerpos contra moléculas de bajo peso molecular.

Para poder llevar a cabo esta reacción de conjugación, es necesario que el analito presente algún grupo funcional que permita su unión covalente a la proteína portadora. En la mayoría de los casos esta circunstancia no se da, por lo que es necesario la preparación de análogos estructurales de la molécula diana que incorporen la funcionalización necesaria para llevar a cabo este acoplamiento. A grandes rasgos, un hapteno funcionalizado consta de tres partes básicas: un esqueleto similar al analito de interés, un grupo funcional que permita su conjugación a proteínas y un brazo espaciador entre ambos elementos. Ante la gran variedad de posibilidades en este

esquema, el diseño de haptenos es la etapa clave cuando se pretende obtener anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia moléculas de bajo peso molecular.

La principal función del brazo espaciador es separar la estructura del analito de la proteína, evitando el enmascaramiento del hapteno y facilitando su interacción con los elementos que constituyen el sistema inmunitario, como receptores de células T y anticuerpos. Se considera de gran importancia que este brazo espaciador no presente grupos altamente inmunogénicos (heteroátomos, dobles o triples enlaces, anillos aromáticos o grupos polares), ya que la respuesta inmune podría centrarse en ellos y no en la estructura del analito.⁹⁸ Para evitar esto, la estrategia más habitual es usar cadenas hidrocarbonadas alifáticas lineales de entre 4 y 6 átomos de carbono como brazo espaciador. Esta longitud de brazo permite la exposición de la estructura del analito sin que llegue a plegarse sobre sí mismo.

Por su parte, el grupo funcional seleccionado para la conjugación debe permitir llevarla a cabo de forma ortogonal, es decir, sin producir reacciones secundarias en las estructuras de hapteno o proteína. Los grupos funcionales más empleados son el carboxilo (–COOH), el sulfhidrilo (–SH), el amino (–NH₂) y el hidroxilo (–OH). La estrategia de conjugación empleada dependerá del grupo funcional introducido en el extremo del brazo espaciador, como se describirá en la sección 1.3.2.

En cuanto a la estructura del analito, la introducción del brazo espaciador funcionalizado debe tener las mínimas repercusiones sobre las propiedades estereoelectrónicas de la molécula original, de manera que se maximice la probabilidad de que los anticuerpos producidos frente al hapteno reconozcan también al analito.⁹⁹ La funcionalización del analito tomando como punto de partida el propio compuesto no siempre es sencilla, o incluso posible. Tradicionalmente se suele recurrir a estrategias de conjugación que conlleven el menor esfuerzo sintético, aprovechando los grupos funcionales reactivos del propio analito.¹⁰⁰ Sin embargo, este tipo de estrategias pueden implicar modificaciones importantes de las propiedades electrónicas o conformacionales de la molécula inicial, así como la eliminación o el enmascaramiento de grupos funcionales con un elevado potencial para interaccionar con los anticuerpos. Este es precisamente el caso de OTA, donde todos los anticuerpos generados hasta la fecha se han obtenido a partir de conjugados en los que la propia micotoxina se ha acoplado a proteínas a través de su grupo carboxilo nativo. Así pues, la obtención del hapteno “ideal” con frecuencia conlleva aproximaciones de síntesis total, las cuales, pese a requerir un mayor esfuerzo sintético, suelen revertir en anticuerpos de mayor afinidad y especificidad.^{99,101}

1.3.1.1 Herramientas para el diseño racional de haptenos

Dada la importancia que, como hemos visto, tiene la estructura del hapteno en las prestaciones analíticas de los anticuerpos, resulta esencial realizar un diseño racional del mismo. Para ello existen dos recursos que resultan de gran ayuda: la modelización molecular y lo que se conoce como el principio de Landsteiner.

Landsteiner propuso que la especificidad de un anticuerpo se dirige fundamentalmente a la porción del hapteno más alejada del brazo espaciador que lo conecta con la proteína transportadora, sugiriendo que el anticuerpo interacciona en mayor medida con la parte del analito que se encuentra espacialmente más distante a la posición utilizada para su anclaje. La consecuencia de este principio es que modificaciones sobre la estructura del analito en la zona más alejada del brazo espaciador pueden afectar de manera importante al reconocimiento del compuesto diana. Por el contrario, si la modificación se realiza sobre la parte más cercana a la proteína portadora, es posible que dichas alteraciones no conlleven una disminución en el reconocimiento por parte del anticuerpo, posibilitando incluso la interacción con análogos del analito que presenten cambios en esa parte de la estructura. Este principio ha sido ampliamente citado, quedando patente su relevancia a la hora de producir anticuerpos empleando haptenos que no presentan la estructura completa del analito.^{102,103}

Por otra parte, la modelización molecular aplicada al diseño de haptenos implica la determinación de la conformación de menor energía tanto del analito como de los haptenos diseñados y su posterior comparación con el fin de determinar qué hapteno se asemeja más al analito a detectar.¹⁰⁴ La modelización molecular hace uso de la mecánica molecular para determinar las conformaciones de menor energía, para después refinarlas empleando métodos semiempíricos de mecánica cuántica. A pesar del gran potencial de estos métodos computacionales, hay que tener siempre en cuenta que el anticuerpo es la pieza principal de un inmunoensayo y que estas aproximaciones no tienen en cuenta este elemento. Por ejemplo, durante la interacción analito–anticuerpo el analito/hapteno podría adoptar una conformación en la cavidad del anticuerpo que puede no ser la más estable cuando este se encuentra libre en disolución, pero que estaría estabilizada por su interacción con los restos de aminoácidos presentes en el paratopo del anticuerpo. En todo caso, el uso de la modelización molecular ha permitido racionalizar la afinidad de un determinado anticuerpo hacia varios compuestos.¹⁰⁵

En el caso concreto de OTA, tanto resultados experimentales como teóricos han mostrado la gran importancia del grupo carboxílico en la conformación natural de la micotoxina. El grupo de Bredenkamp demostró, mediante cristalografía de rayos X, que el grupo carboxilo nativo de OTA

participa en la formación de enlaces de hidrógeno que condicionan su estructura cristalográfica.¹⁰⁶ Por su parte, además de estudios computacionales, Dais y colaboradores llevaron a cabo un estudio conformacional en cloroformo mediante resonancia magnética nuclear que también demuestra la formación de enlaces de hidrógeno en los que interviene dicho grupo carboxilo.¹⁰⁷ En definitiva, ambos estudios probaron que en la estructura bicíclica del fragmento de dihidroisocumarina la libertad conformacional es muy limitada. Por el contrario, el fragmento de Phe presenta varios enlaces simples que permiten su libre rotación, lo que posibilita la formación de varios enlaces de hidrógeno intramoleculares (Figura 1.7) que determinan su conformación más estable. Además, debido a las características electrónicas y estructurales de este grupo funcional, su capacidad antigénica y para formar interacciones de tipo iónico puede ser determinante en la conformación del sitio de unión del anticuerpo, por lo que mantenerlo inalterado en el hapteno inmunizante podría dar lugar a la generación de anticuerpos con afinidades frente a OTA superiores a los previamente descritos en la literatura.

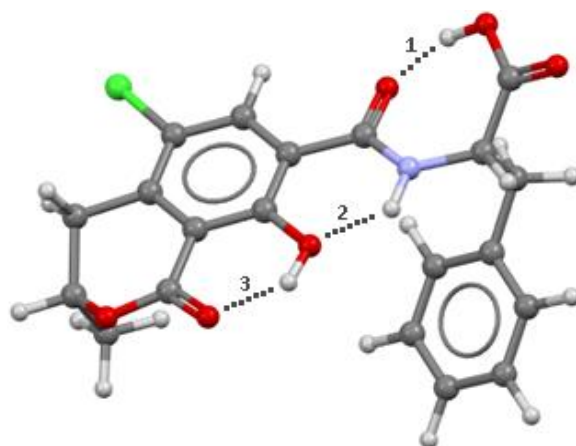


Figura 1.7. Posibles enlaces de hidrógeno intramoleculares presentes en la estructura neutra de OTA.

1.3.2 Preparación de conjugados proteicos

Una vez sintetizado el hapteno, el siguiente paso es su acoplamiento covalente a una proteína a través de los grupos funcionales de los aminoácidos que la componen. Entre los grupos funcionales más empleados con este objetivo se encuentran los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, los grupos carboxilato de los residuos de los ácidos aspártico y glutámico, o los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína. El número de residuos es variable en función de la proteína, hecho que, sumado a la vía de conjugación, se ha tener en cuenta a la hora de seleccionarla. En principio, cualquier proteína exógena al animal a inmunizar y que contenga suficientes grupos accesibles del tipo deseado es válida para la preparación de un conjugado proteína-hapteno. Entre las proteínas más empleadas se encuentran las seroalbúminas bovina (BSA) y humana (HSA), la

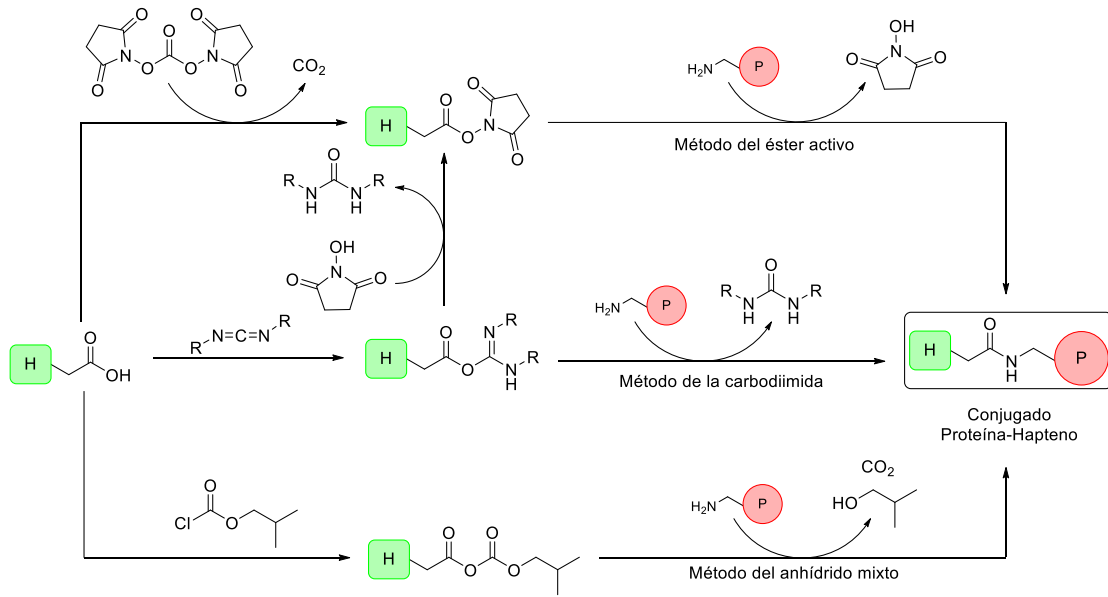
ovoalbúmina (OVA) y las hemocianinas de lapa de cerradura gigante (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*) y del cangrejo herradura (HCH, *horseshoe crab hemocyanin*).

En este sentido, la BSA es ampliamente utilizada debido principalmente a su elevada inmunogenicidad, tolerancia a cargas hapténicas elevadas sin pérdida de solubilidad, elevada estabilidad física y química, disponibilidad y bajo coste. Además, permite determinar fácilmente el número de moléculas de hapteno acopladas mediante espectrometría de masas y presenta una elevada tolerancia a diferentes disolventes orgánicos polares, en los cuales normalmente son solubles los haptenos. En definitiva, existe un amplio abanico de posibilidades a la hora de preparar un conjugado proteína–hapteno.¹⁰⁸ Los métodos más usuales de conjugación de haptenos funcionalizados se representan esquemáticamente en la Figura 1.8.

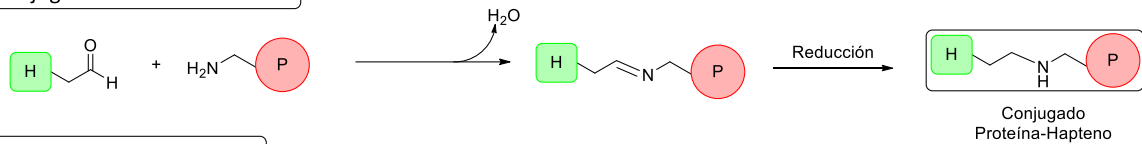
En cuanto a los haptenos, el caso más frecuente es introducir un grupo carboxílico en el extremo del brazo espaciador, y generar así un enlace amida con los grupos amino de la proteína transportadora.^{109,110} Para poder llevar a cabo esta reacción en condiciones suaves, es necesario activar previamente el ácido carboxílico del hapteno. Existen varios derivados de este tipo, pero el más empleado en la preparación de conjugados proteína–hapteno es el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (método del éster activo), ya que presenta la ventaja de que el producto activado es relativamente estable en condiciones anhidras y se puede purificar, lo que facilita el control de la relación hapteno/proteína (RM) durante el proceso de conjugación. Una vez activado el grupo carboxilo, se hace reaccionar con la proteína en medio ligeramente básico, de forma que los grupos amino estén desprotonados y sean más reactivos.

La RM de un conjugado proteína–hapteno es el parámetro que mejor caracteriza a este inmunorreactivo, y su valor óptimo dependerá de la finalidad para la que se haya diseñado. A modo de ejemplo, un conjugado que se va a utilizar como inmunógeno requiere un valor moderadamente elevado de RM para potenciar la respuesta inmunitaria. Por el contrario, para los conjugados destinados a ser utilizados en el desarrollo de inmunoensayos competitivos, es recomendable un valor más reducido de RM, tal y como se detallará más adelante. La RM de un conjugado puede ser estimada fácilmente empleando espectrofotometría UV/Vis cuando el hapteno absorbe en esta región del espectro electromagnético. No obstante, la elevada resolución de los equipos que hacen uso de espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplado a un analizador por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) permiten la medida precisa de la masa de macromoléculas, por lo que su utilización para el cálculo de la densidad hapténica de conjugados ha experimentado un gran auge en los últimos años.^{111,112}

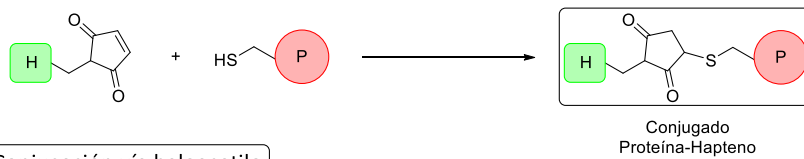
Conjugación de haptenos con grupo carboxilato



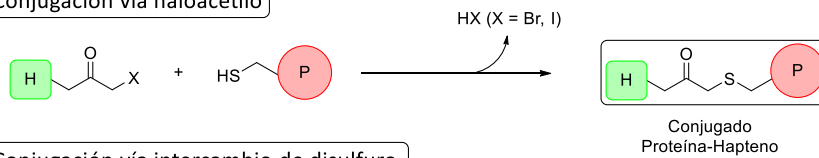
Conjugación vía base de Schiff



Conjugación vía maleimida



Conjugación vía haloacetilo



Conjugación vía intercambio de disulfuro

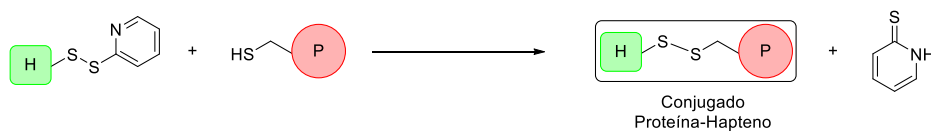


Figura 1.8. Métodos más comunes para la obtención de conjugados proteína-hapteno a partir de los grupos amino y sulfhidrilo libres de la proteína.

1.3.2.1 Alternativas de conjugación: cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC)

En ocasiones, el acoplamiento entre hapteno y proteína no es posible, al menos de forma sencilla, mediante ninguna de las vías descritas en la sección anterior. El hapteno puede presentar grupos funcionales no compatibles con la estrategia de conjugación, haciendo necesarias etapas

de protección y desprotección durante la preparación y activación del mismo. Ante esta problemática, una posible solución es incluir un grupo funcional que permita llevar a cabo la conjugación de forma ortogonal, de manera que los grupos reactivos nativos no se vean afectados. La inclusión de este nuevo grupo funcional en el hapteno suele implicar la modificación de la proteína con un grupo complementario que pueda reaccionar con él.

Un acoplamiento susceptible de ser aplicado en este ámbito son las reacciones de tipo “click”. La más representativa de ellas es la conocida como reacción de Huisgen, una cicloadición [3+2] entre un grupo azida y un grupo alquino para dar lugar a los isómeros 1,4 y 1,5 de un anillo de triazol.¹¹³ Una versión mejorada de esta reacción es la catalizada por Cu (I), abreviada como CuAAC,^{114,115} que permite controlar el isómero de triazol obtenido (Figura 1.9). Cualquier sal de cobre (I) puede ser empleada como catalizador, aunque en la práctica lo más común es el uso de sales de cobre (II), tales como CuSO₄ o Cu(AcO)₂, acompañadas de un agente reductor, normalmente ascorbato sódico. También es habitual el uso de ligandos de carácter básico que estabilicen el ion de Cu (I).¹¹⁶ La versatilidad de esta reacción con respecto al disolvente es muy amplia, siendo viable incluso en medio acuoso, lo que la convierte en una candidata para el marcaje de biomoléculas.

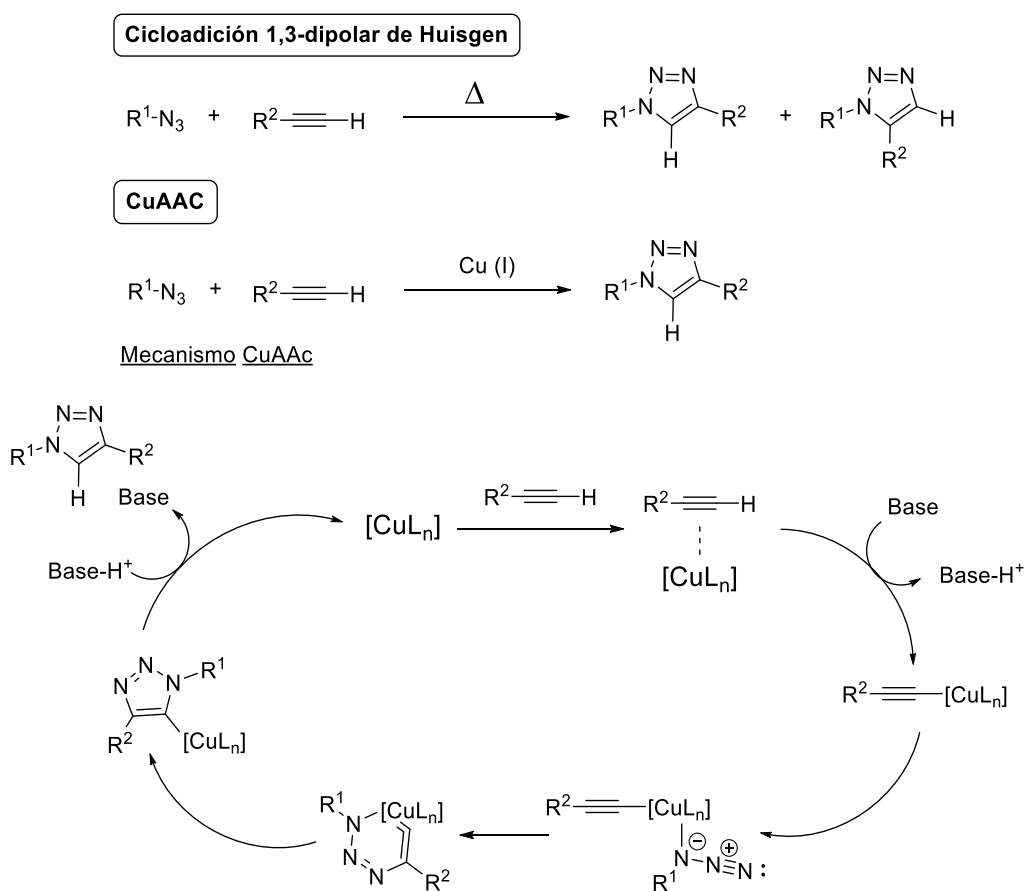


Figura 1.9. Mecanismo de cicloadición [3+2] dipolar azida-alquino catalizado por cobre (CuAAC).

Para poder aplicar esta estrategia a la preparación de conjugados proteína–hapteno es necesario incluir los grupos azida y alquino en las estructuras de los dos componentes a acoplar. Ambos grupos funcionales son susceptibles de ser incluidos en la proteína, ya que no hay riesgo de hidrólisis ni de reacciones secundarias con residuos de aminoácidos. No obstante, la aproximación más habitual es incluir el grupo químicamente más estable, el grupo azida, en el hapteno, para así facilitar la síntesis química de este, siendo necesaria la modificación de la proteína con grupos alquino. El acoplamiento suele llevarse a cabo vía CuAAC, para así asegurar la obtención del triazol 1,4-disustituido y favorecer la proyección del hapteno desde la proteína (Figura 1.10).

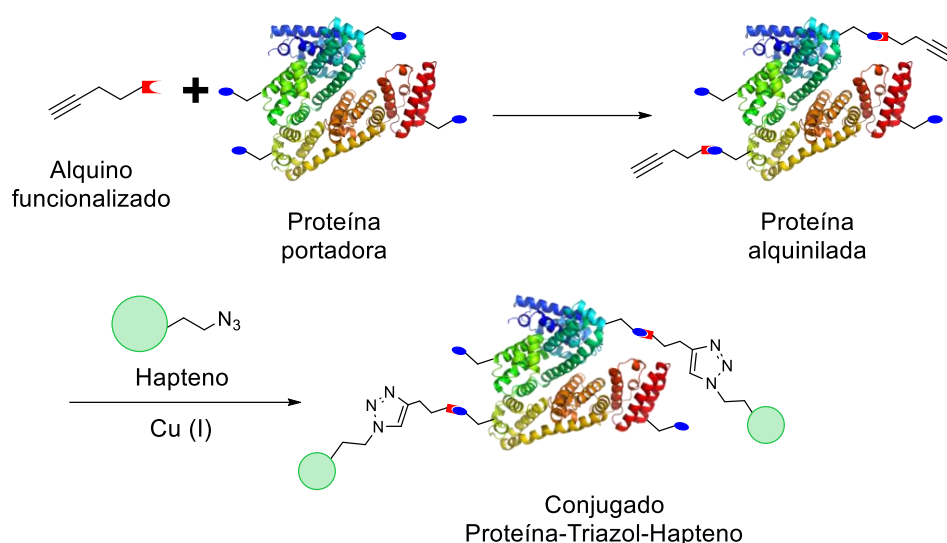


Figura 1.10. Conjugación de haptenos basados en grupo azida mediante modificación proteica con grupos alquino.

Aunque esta reacción ha sido ampliamente usada en condiciones suaves para marcar con bajas RM proteínas,¹¹⁷ células¹¹⁸ y una gran variedad de macromoléculas,^{119–121} apenas se ha utilizado en el campo de la producción de anticuerpos con fines de inmunodiagnóstico, posiblemente debido al potencial carácter inmunogénico del anillo de triazol. Algunos autores han intentado producir anticuerpos contra analitos de bajo peso molecular empleando conjugados preparados por esta vía, pero obteniendo siempre resultados negativos. Sanders y colaboradores obtuvieron una baja respuesta en antiseros de ratón cuando intentaron obtener anticuerpos contra la micotoxina deoxynivalenol.¹²² Por su parte, el grupo de Hammock obtuvo resultados similares para la neurotoxina tetrametilendisulfotetramina (TETS).¹²³ El único ejemplo hasta la fecha en el que se describe la preparación de conjugados inmunogénicos empleando esta aproximación es el descrito por Blixt y colaboradores.¹²⁴ Este grupo empleó química “click” para acoplar polisacáridos de peso molecular relativamente alto a estructuras víricas para producir anticuerpos policlonales de gallina.

Como ya se ha señalado previamente, esta aproximación de conjugación es especialmente útil cuando el hapteno presenta grupos funcionales que no son compatibles con las aproximaciones clásicas de conjugación. Un ejemplo de este grupo de analitos es la propia OTA, en la que el grupo ácido presente en su estructura dificulta enormemente su conjugación por una posición distinta al grupo carboxilato.

1.3.3 Generación de anticuerpos específicos

Una de las consecuencias más relevantes de la exposición del sistema inmune a un antígeno es la biosíntesis y secreción de anticuerpos por parte de células especializadas, principalmente linfocitos B. Los anticuerpos son glicoproteínas capaces de unirse a su antígeno con una afinidad y especificidad elevadas. Es precisamente esta gran capacidad de reconocimiento molecular en la que radica su potencialidad como reactivos de interés analítico y en aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.¹²⁵

Algunos de los animales comúnmente empleados en investigación para la generación de anticuerpos son conejos, ratones y cabras. La generación de una respuesta inmune frente a un antígeno en vertebrados es un complejo proceso en el que participan, de forma coordinada, un gran número de componentes. La forma tradicional de desencadenar artificialmente una respuesta inmune es mediante la inoculación periódica (vacunación) con la sustancia frente a la que se quiere generar inmunidad (un patógeno inactivado o una parte del mismo, como en algunas vacunas, o un conjugado proteína–hapteno en el caso de moléculas pequeñas), acompañada normalmente de un adyuvante que actúa como agente inmunopotenciador.¹²⁶

Cuando el conjugado proteína–hapteno es detectado por el organismo, se activa en primer lugar la respuesta inmunitaria innata, donde la fagocitosis de este conjugado por parte de células especializadas (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) presentadoras de antígeno (APCs, *antigen-presenting cells*) es el primer paso en la cascada de acontecimientos que desembocan en la denominada respuesta inmune adaptativa (Figura 1.11).¹²⁷ Tras ser fagocitado, el conjugado es hidrolizado en el interior de la célula en oligopéptidos de entre 10 y 25 aminoácidos, muchos de los cuales llevarán acoplado el hapteno que formaba parte del conjugado. Estos péptidos y péptidos–hapteno son capturados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II), que se desplazan hasta la superficie de las APCs para presentar en su membrana el péptido capturado y a su vez el hapteno incorporado. Algunos linfocitos T auxiliares (T_H , *T helper cells*) preexistentes serán capaces de interactuar, aunque con baja afinidad, con el complejo péptido/MHC II en la superficie de la APC a través de su receptor específico de antígeno. Como consecuencia de esta interacción, se desencadenan una serie de procesos bioquímicos, incluida la

liberación de citoquinas, que llevan a la activación y proliferación de aquellas células T_H que han interactuado con las APCs.

Como ya hemos comentado, los linfocitos B, además de producir anticuerpos, tienen la capacidad de invaginar antígenos de forma específica a través de Ig situadas en su membrana. Al igual que en el caso de los receptores de las células T_H , estas Igs presentan de manera innata una gran variabilidad, lo que posibilita el reconocimiento de prácticamente cualquier epítipo. Una vez endocitado, el complejo Ig-antígeno es también degradado intracelularmente en péptidos de pequeño tamaño, que son capturados y presentados por una molécula de MHC II, al igual que ocurría con otras APCs. De este modo, si un linfocito T_H previamente activado por el reconocimiento de un cierto complejo péptido/MHC II, reconoce el mismo complejo presentado por un linfocito B, tiene lugar la activación de este último. Ello conlleva su expansión clonal y su diferenciación en células plasmáticas y linfocitos B de memoria. Las células plasmáticas están preparadas para la secreción masiva de anticuerpos con idéntica capacidad de reconocimiento de antígeno que las Igs de membrana del linfocito B original, y solo sobreviven unos pocos días hasta contener la infección. En cambio, los linfocitos B de memoria son capaces de perdurar incluso años, y constituyen la base de la inmunidad a largo plazo. Ante sucesivas exposiciones al conjugado, se activarán y proliferarán en mayor medida aquellos linfocitos B que producen los anticuerpos de mayor afinidad, produciéndose una maduración de la respuesta inmune y la producción de anticuerpos con afinidad creciente.

Para conseguir una fagocitosis más eficiente por parte de las APCs y una respuesta inmunitaria más potente, se emplean adyuvantes.¹²⁶ Los más conocidos son las sales de aluminio, usados para formar geles, y los aceites minerales, empleados para preparar emulsiones. Dentro de este último grupo se encuentra el conocido como adyuvante de Freund, formulado por primera vez en 1937.¹²⁸ Este adyuvante está compuesto por una mezcla de aceite de parafina y monooleato de manosa. Su versión completa contiene además formas inactivadas y fragmentos de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. La mezcla de este adyuvante (medio apolar) con una disolución del antígeno (medio acuoso) origina una emulsión, que tras ser inoculada forma depósitos insolubles que permiten la liberación lenta del antígeno, potenciando así la respuesta inmune previamente descrita.

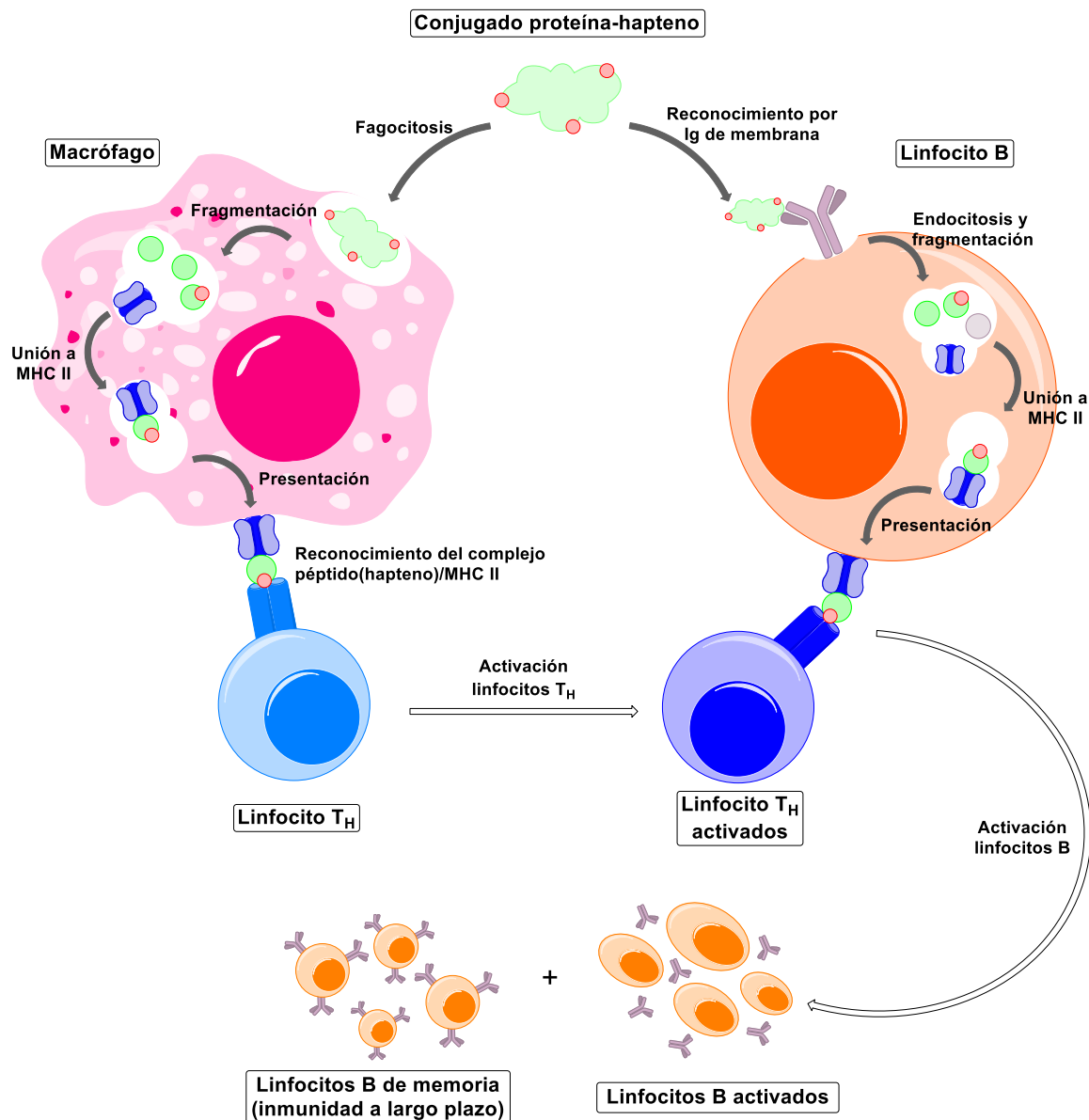


Figura 1.11. Mecanismo de la respuesta inmunitaria adaptativa frente a un antígeno de naturaleza peptídica.

1.3.3.1 Estructura de las inmunoglobulinas

Como hemos comentado, los anticuerpos, o inmunoglobulinas, son glicoproteínas bifuncionales producidas por los linfocitos B como parte de la respuesta del sistema inmunológico ante la presencia de moléculas o agentes extraños (antígenos) en el organismo. Su estructura tiene forma de “Y”. Para una descripción más detallada, se usará como modelo una inmunoglobulina tipo G (IgG), las más abundantes, ya que constituyen aproximadamente el 80% del total de las inmunoglobulinas séricas. Las IgG son heterodímeros de unos 150 kDa de peso molecular formados por dos cadenas polipeptídicas idénticas de 50 kDa y dos cadenas de 25 kDa también idénticas, denominadas cadenas pesadas (H) y ligeras (L), respectivamente (Figura 1.12). Las cadenas pesadas están unidas entre sí por dos enlaces disulfuro, mientras que un único puente disulfuro une cada

una de ellas a una de las cadenas ligeras. Las IgG son receptores bivalentes, con dos sitios de unión a antígeno o paratopos constituidos por los extremos *N*-terminal de las cadenas pesadas y ligeras, por tanto, capaces de unirse a dos moléculas de antígeno de forma simultánea.

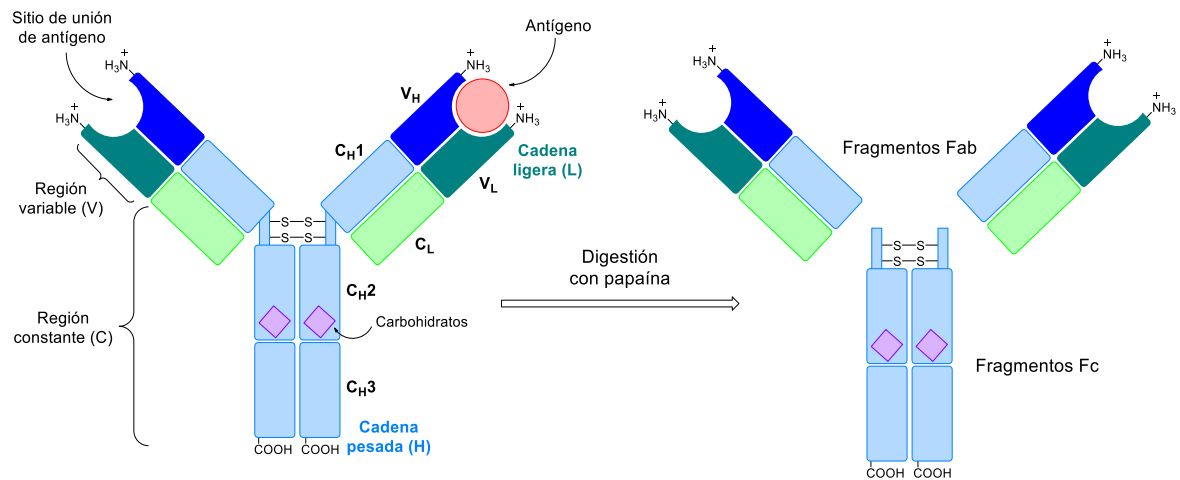


Figura 1.12. Inmunoglobulina G (IgG). Se indican los dominios (V_H , V_L , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_L), tipos de cadenas peptídicas (H y L) y regiones de su estructura (constante y variable), así como los fragmentos en que puede dividirse mediante proteólisis enzimática parcial con papaína (Fab y Fc).

La estructura primaria de las cadenas que componen las IgG están formadas por la unión de secuencias de unos 110 aminoácidos, denominadas dominios. Las cadenas pesadas constan de cuatro dominios, mientras que las cadenas ligeras solo contienen dos. Estos dominios se agrupan para formar los dos fragmentos Fab (*fragment antigen binding*), y el fragmento Fc (*fragment that crystallizes*). Cada uno de los fragmentos Fab está compuesto por cuatro dominios, dos de ellos pertenecientes a la cadena pesada y dos a la cadena ligera. Además, dentro de los cuatro dominios de cada fragmento Fab, uno pesado y uno ligero componen la región variable de los fragmentos Fab (V_H y V_L) que darán lugar al paratopo o sitio de unión del antígeno. Esta región del anticuerpo variará para cada inmunoglobulina producida contra un determinado antígeno, dependiendo su afinidad de los aminoácidos presentes en el paratopo. Los dos dominios restantes del Fab son constantes e idénticos para todas las Ig (C_{H1} y C_L). Por su parte, el fragmento Fc está formado por cuatro dominios pesados constantes, idénticos dos a dos (C_{H2} y C_{H3}), que contienen los sitios de glicosilación. La agrupación de dominios C_H y C_L constituye la región constante de la IgG, mientras que la región variable está formada por los dominios V_H y V_L . Los diferentes dominios de una IgG se agrupan para dar lugar a tres lóbulos, obteniéndose así la forma de "Y". En la región central de la macromolécula se sitúa la región bisagra, llamada así por su elevada flexibilidad, que permite la movilidad de los lóbulos que conforman la IgG.¹²⁹ La utilización de enzimas proteolíticas puede dar lugar a la ruptura de la IgG en sus diferentes fragmentos. Así, la utilización de papaína permite la

fragmentación selectiva de las cadenas pesadas en la región bisagra por encima de los enlaces disulfuro que las unen, liberando los tres lóbulos de la IgG original.

Las diferentes variaciones en las secuencias de las regiones constantes de las Ig dan lugar a diferencias en su tamaño, carga, solubilidad y función. Estas variaciones originan distintos tipos de cadenas pesadas y ligeras, lo que a su vez permite la clasificación de las Ig en varias subclases. Las cadenas pesadas existentes son α , δ , ϵ , γ y μ , mientras que en la cadena ligera solo son dos, κ o λ . La función de una Ig no se ve afectada por la cadena ligera, pero está estrechamente relacionada con el tipo de cadena pesada que la conforma. Por ello, cada tipo de cadena pesada da lugar a una clase o isotipo de Ig: IgA (cadena α), IgD (cadena δ), IgE (cadena ϵ), IgG (cadena γ) e IgM (cadena μ). Entre ellas, las IgG destacan por su presencia mayoritaria en el suero sanguíneo y por su mejorada afinidad y especificidad hacia los antígenos, lo que deriva del hecho de que se producen como parte de la maduración de la respuesta inmunitaria, tal y como se ha descrito en la sección 1.3.3.

1.3.3.2 Tipos de anticuerpos según su modo de generación

En el área de la producción biotecnológica de anticuerpos se distinguen tres variedades en función de su método de producción: policlonales (pAb), monoclonales (mAb) y recombinantes (rAb).

Los anticuerpos policlonales, o antiseros, se obtienen directamente del suero sanguíneo del animal inmunizado y constituyen una mezcla de todos los anticuerpos generados frente a un inmunógeno. Cada uno de ellos procederá de un linfocito B diferente y por lo tanto presentará una afinidad y especificidad distintas. Por ello, son un reflejo de la respuesta inmunitaria global, lo que convierte a los antiseros en reactivos muy adecuados para llevar a cabo estudios comparativos con diferentes inmunógenos. Su obtención es relativamente sencilla, económica y rápida (habitualmente de 3 a 4 meses), pero presentan como principal inconveniente su carácter limitado y su baja reproducibilidad debido a la variabilidad entre animales inmunizados. No obstante, muchos de los estudios en esta temática, e incluso kits comerciales, están basados en la utilización de este tipo de anticuerpos obtenidos en conejo, pues la producción que se obtiene a partir de un solo animal es suficiente para realizar miles de inmunoensayos.

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas obtenidas *in vitro* mediante la generación y cultivo de células denominadas hibridomas,¹³⁰ como se describirá en la siguiente sección. Los hibridomas se generan a partir de la fusión entre un linfocito B del animal inmunizado y una célula de mieloma capaz de crecer en cultivo. La afinidad y especificidad de este tipo de anticuerpo viene definidas por el linfocito productor fusionado, y pueden obtenerse de manera

ilimitada y reproducible, ya que los hibridomas pueden ser cultivados *in vitro*. A cambio, su generación es más compleja, costosa y lenta (alrededor de 6 meses), si bien suelen poseer una afinidad muy elevada hacia el analito a detectar.

Por último, los anticuerpos recombinantes se obtienen mediante técnicas de biología molecular, partiendo de librerías génicas sintéticas o mediante clonación de los genes que codifican las inmunoglobulinas en células productoras, como linfocitos B o hibridomas. La expresión de estos genes en otros organismos posibilita la modificación de las propiedades de unión del anticuerpo mediante mutagénesis.¹³¹

1.3.3.3 Producción de anticuerpo monoclonales

Tal y como ya se ha comentado, la producción de mAbs pasa por la previa generación y aislamiento de hibridomas, tecnología descrita por Georges Köhler y César Milstein en 1975.¹³⁰ Esta tecnología surgió ante la necesidad de obtener anticuerpos de forma reproducible y homogénea, evitando así los problemas asociados al uso de anticuerpos policlonales. Esta técnica tuvo tal relevancia que ambos científicos recibieron por ello el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1984. El procedimiento, esquematizado en la Figura 1.13, implica la fusión celular de linfocitos B del bazo de un animal inmunizado, usualmente un ratón, con células tumorales de mieloma de la misma especie. Ello da lugar a la generación de células híbridas, denominadas hibridomas, cuya posterior selección, aislamiento y conservación permite disponer del anticuerpo de forma ilimitada.

Como ya se ha señalado previamente, la razón por la que es necesario fusionar los linfocitos B radica en el hecho de que este tipo de célula no es capaz de sobrevivir más de unos días *in vitro*, por lo que su cultivo no es una técnica viable para la producción de anticuerpos. Al fusionarlos con células tumorales capaces de dividirse indefinidamente, las células híbridas resultantes poseen la capacidad de producir anticuerpos y de crecer en cultivo de manera ilimitada. Para llevar a cabo esta fusión celular es habitual el uso de polietilenglicol (PEG), compuesto capaz de disolver de forma parcial las membranas celulares, favoreciendo así la hibridación entre células adyacentes. La fusión de células se realiza al azar, generando una población muy heterogénea formada por híbridos mieloma–mieloma, linfocito–linfocito y linfocito–mieloma (hibridomas), además de linfocitos y células de mieloma sin fusionar.

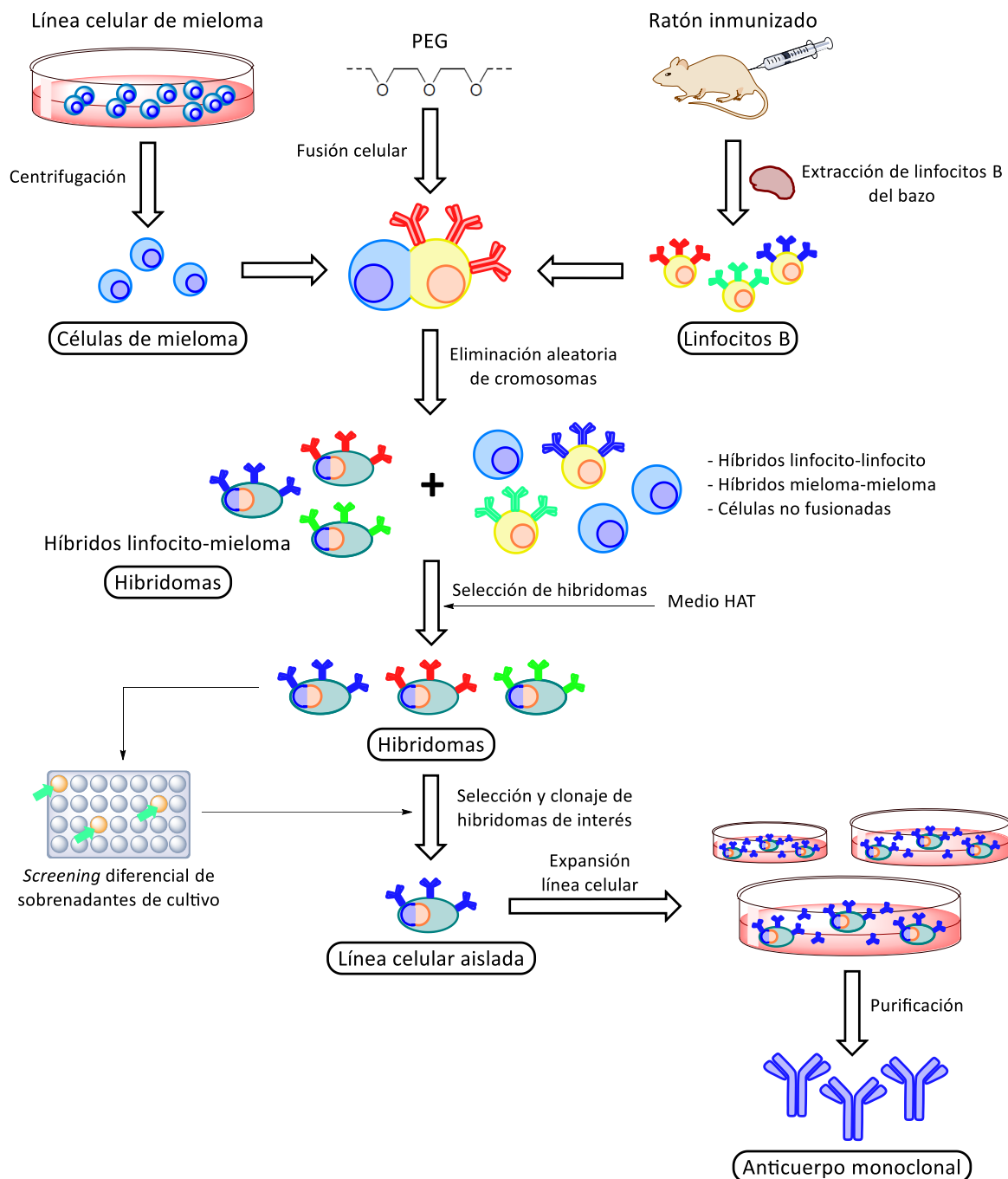


Figura 1.13. Procedimiento experimental simplificado para la obtención de anticuerpos monoclonales mediante generación y aislamiento de hibridomas.

La mezcla de células obtenida hace necesaria una etapa de selección que permita separar los hibridomas del resto de tipos celulares. Los linfocitos sin fusionar y los híbridos linfocito-linfocito no representan un problema, ya que no sobreviven más allá de unos pocos días. El verdadero problema radica en los mielomas sin fusionar y en los híbridos mieloma-mieloma, capaces de crecer de forma ilimitada en medio de cultivo, pudiendo llegar a desplazar a los hibridomas de interés. Una selección química empleando aminopterina permite superar este problema. En las células animales existen dos posibles rutas para la síntesis de los nucleótidos de

purina necesarios para la síntesis de ADN, la “ruta natural” y la “ruta alternativa”; la aminopterina bloquea selectivamente la “ruta natural”, lo que da lugar a la activación de la “ruta alternativa”. La línea tumoral de mieloma empleada en la fusión celular presenta una mutación en uno de los genes que participan en la vía alternativa de la síntesis de purinas, de forma que se encuentra inutilizada. Por lo tanto, en presencia de aminopterina, las células de mieloma no son capaces de incorporar el pirofosfato de fosforribosilo (PRPP) en los nucleótidos de purina. En cambio, los hibridomas, al proceder de linfocitos B, que no tienen alterada dicha ruta alternativa, podrán emplearla para la producción de estos nucleótidos utilizando hipoxantina y timidina como precursores (Figura 1.14). De este modo, para llevar a cabo la selección química se emplea como medio post-fusión el denominado medio HAT, medio que contiene los tres componentes del proceso: hipoxantina, aminopterina y timidina.

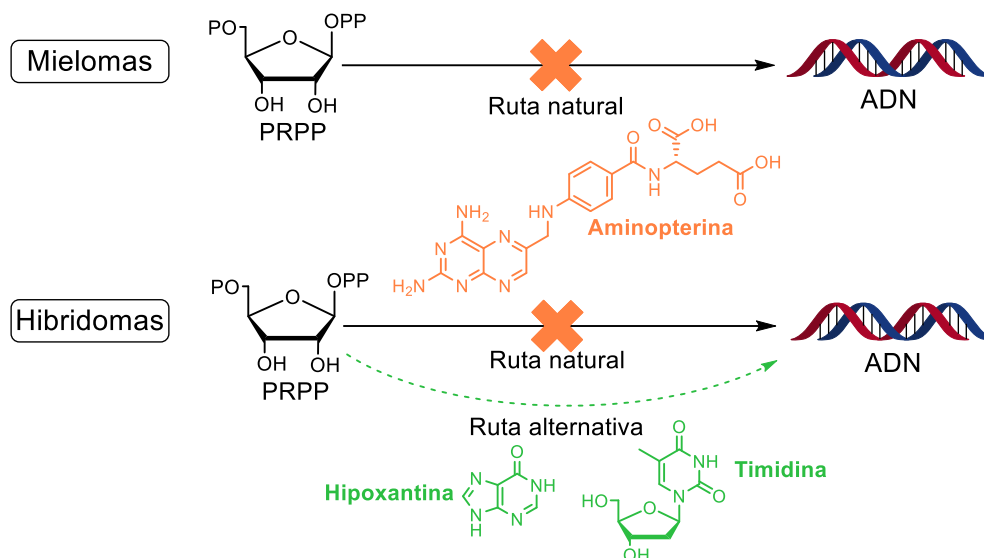


Figura 1.14. Efecto del medio HAT en las rutas de biosíntesis *de novo* y alternativa de ADN.

Al cabo de 10-12 días, se evalúa la capacidad de los sobrenadantes de cultivo para producir anticuerpos específicos contra el analito problema. Ensayos como el ELISA diferencial permiten determinar simultáneamente la capacidad de un anticuerpo para reconocer el hapteno a partir del cual se ha producido y el analito diana en su forma libre.¹³² Adicionalmente, una reevaluación de los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA competitivo bidimensional permite seleccionar los hibridomas productores de los anticuerpos con mayor afinidad hacia el analito.¹³³

Dado que el pocillo de una placa de cultivo puede contener una mezcla de varios hibridomas, se hace necesario el aislamiento de la línea celular productora. Este proceso se denomina clonación celular y se lleva a cabo mediante el método de dilución límite, que consiste en distribuir el contenido celular del pocillo original en una nueva placa a una concentración de una célula por pocillo. Tras varios días, se reanalizan los sobrenadantes de cultivo y se repite el

ciclo hasta asegurar que el hibridoma seleccionado procede de una única célula. Una vez garantizada su monoclonalidad, la línea celular se cultiva hasta tener una población suficiente que permita su almacenamiento en N₂ líquido y la producción de un volumen adecuado de sobrenadante de cultivo a partir del cual purificar el anticuerpo monoclonal.

1.3.4 Caracterización de anticuerpos y diseño del inmunoensayo

Una vez se dispone de anticuerpos, es necesaria la evaluación de sus prestaciones analíticas con el fin de seleccionar los más adecuados para el desarrollo del método inmunoquímico deseado.

La afinidad y la especificidad hacia el analito son las dos características más importantes a la hora de definir las propiedades de cualquier anticuerpo. La afinidad se puede definir como la suma de todas las fuerzas repulsivas y atractivas (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de van der Waals y/o hidrofóbicas) que se producen entre el determinante antigénico (epítipo) y los aminoácidos que constituyen el sitio de unión del anticuerpo (paratopo) y suele expresarse en términos de disociación del complejo anticuerpo–analito, de modo que un anticuerpo es tanto más afín cuanto menor es su constante de disociación.

Por su parte, la especificidad de un anticuerpo se relaciona con su capacidad para reconocer de forma exclusiva al analito de interés. En función de las necesidades analíticas, puede ser deseable que un anticuerpo sea lo más específico posible, evitando así interferencias debidas al reconocimiento de compuestos estructuralmente similares al analito. Sin embargo, en ocasiones puede ser interesante que el anticuerpo sea menos selectivo y, por tanto, capaz de interactuar con varios compuestos emparentados.¹³⁴

1.3.4.1 ELISA competitivo y sus formatos

La técnica ELISA es una de las principales metodologías empleadas en inmunodiagnóstico. En el caso de compuestos de bajo peso molecular, como OTA, este tipo de ensayos han de ser necesariamente competitivos ya que los analitos de pequeño tamaño constituyen un único epítipo, pudiendo interactuar con un solo anticuerpo. Como competidor se emplean conjugados proteicos, con o sin actividad enzimática, marcados covalentemente con el hapteno que ha sido empleado durante la generación del anticuerpo, o con un hapteno estructuralmente relacionado.

Estos métodos se basan en una reacción en la que, además del analito diana, participan dos inmunorreactivos: anticuerpo y conjugado competidor. Uno de ellos será inmovilizado en un soporte sólido, mientras que el inmunorreactivo complementario, marcado enzimáticamente, se

empleará en disolución. El analito competirá con el hapteno presente en el conjugado competidor para ocupar el paratopo del anticuerpo. La señal obtenida, tras la adición del sustrato de la enzima, dependerá de la relación analito/conjugado que haya interactuado con el anticuerpo. Para que exista una competición eficaz, los inmunorreactivos deben estar en cantidades limitantes. De esta forma, en el caso extremo de ausencia de analito, todo el anticuerpo quedará unido al conjugado proteína-hapteno, obteniéndose así la señal máxima del ensayo (A_{\max}). Por el contrario, la presencia de analito provocará el desplazamiento del conjugado del sitio de unión del anticuerpo, produciéndose un descenso progresivo de la señal a medida que aumenta su concentración. La señal generada será, por lo tanto, inversamente proporcional a la concentración de analito.

El soporte más habitual en este tipo de ensayos es la microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Aunque existen placas comerciales que poseen en su superficie grupos activados que permiten la inmovilización covalente de proteínas, las más comunes son las que su superficie ha sido activada con rayos gamma, de modo que la inmovilización inicial del inmunorreactivo se produce por adsorción inespecífica, un procedimiento muy sencillo y a la vez robusto.

La señal generada dependerá de la enzima empleada para marcar el inmunorreactivo y del sustrato utilizado. Las enzimas más habituales en la técnica ELISA son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*). La AP cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato en medio básico, siendo un sustrato común de esta enzima el fosfato de *p*-nitrofenilo (PNPP), cuyo producto de hidrólisis es amarillo (405 nm).¹³⁵ En cuanto a la HRP, es capaz de oxidar ciertos sustratos con la ayuda de H_2O_2 . Los sustratos comúnmente empleados para esta enzima son la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), la *o*-fenilendiamina (OPD) y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), todos ellos cromogénicos. Como ejemplo, la OPD es un sustrato incoloro que tras ser oxidado da lugar a 2,3-diaminofenazina, compuesto que en medio ácido presenta color naranja con un máximo de absorción a 492 nm. Además, la HRP también posibilita el uso de sustratos cuyos productos generan fluorescencia, como el ácido homovalínico, o bien quimioluminiscencia, como el luminol.¹³⁶

La representación de la señal frente a la concentración de analito en escala logarítmica da lugar a una curva decreciente de tipo sigmoide que se suele ajustar a una función logística de cuatro parámetros (Figura 1.15). 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 esta tanto mayor cuanto menor sea dicha concentración. Tradicionalmente, este valor se denomina IC_{50} , ya que coincide con la concentración que proporciona una inhibición de la A_{\max} del 50% si la absorbancia mínima (A_{\min}) está próxima a cero.

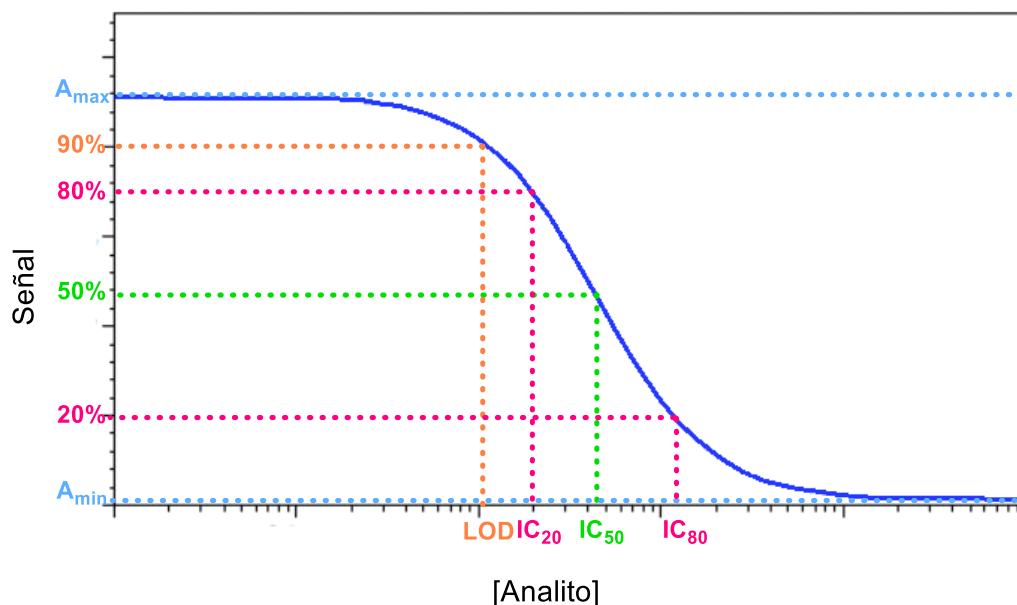


Figura 1.15. Modelo de curva de inhibición sigmoide en un ELISA competitivo, obtenida como representación de la señal del ensayo frente a la concentración de analito en escala semilogarítmica.

Otros parámetros analíticos de interés son el límite de detección del inmunoensayo (LOD, *limit of detection*) y el rango de cuantificación. El LOD se define como la concentración mínima de analito que puede ser detectada por el ensayo y normalmente está asociado al 90% de la señal máxima. Por su parte, el rango de cuantificación suele establecerse como el intervalo de concentraciones que dan lugar a inhibiciones de la señal máxima entre el 20% y el 80% (IC_{80} e IC_{20} , respectivamente).

Existen diversos formatos ELISA en función de qué inmunorreactivo se inmoviliza inicialmente en la microplaca, aunque todos ellos tienen en común al menos tres etapas: el recubrimiento o tapizado inicial de la superficie de los pocillos con uno de los inmunorreactivos, la competición entre analito y conjugado, y la obtención de señal mediante la adición del sustrato de la enzima empleada, también llamado revelado de la actividad enzimática. Entre cada una de estas etapas se intercala una etapa de lavado, de manera que se elimine todo inmunorreactivo que no haya quedado retenido.

Uno de los formatos ELISA más empleado para analitos de bajo peso molecular es el conocido como ELISA competitivo directo o de anticuerpo inmovilizado (cdELISA). En este formato, el anticuerpo, adsorbido en la superficie del pocillo, interaccionará con el analito y un conjugado enzimático, ambos en disolución. En función de la afinidad del anticuerpo hacia cada uno de ellos y de sus concentraciones, se formará más o menos complejo anticuerpo–analito. Tras una etapa de lavado, la adición del sustrato enzimático permite la obtención de la señal (Figura 1.16). En este formato, la adsorción del anticuerpo sobre la superficie se lleva cabo de forma inespecífica; esta

inmovilización incontrolada puede provocar el bloqueo del sitio de unión de antígeno, de manera que no todas las moléculas de anticuerpo serían completamente funcionales. Para minimizar esto, una variante de este formato emplea un anticuerpo de captura capaz de reconocer al anticuerpo de ensayo a través de la zona no implicada en la interacción, el dominio Fc. De esta manera, el anticuerpo de interés no está en contacto con la superficie de la microplaca y queda inmovilizado de forma más direccional, asegurando que el paratopo sea accesible durante la etapa de competición. Esta modalidad se conoce como ensayo ELISA competitivo directo asistido por anticuerpo de captura.

Un segundo formato competitivo es el basado en el recubrimiento de los pocillos con un conjugado proteína–hapteno, el denominado ensayo de conjugado inmovilizado o competitivo indirecto (ciELISA). En la etapa competitiva de este formato, analito y conjugado compiten por unirse al anticuerpo que se encuentra en disolución. Dado que tras esta etapa de competición no existe marca enzimática, se hace necesaria la adición de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente capaz de reconocer al anticuerpo específico. Tras la interacción del anticuerpo secundario marcado con el anticuerpo específico que se haya unido al conjugado inmovilizado, se revela la actividad enzimática (Figura 1.17). Una alternativa a este formato que evita el uso del anticuerpo secundario consiste en marcar directamente el anticuerpo primario con la enzima. Esta aproximación, a pesar de ser atractiva debido a que involucra una etapa menos de ensayo, suele conllevar una menor sensibilidad debido a la pérdida de amplificación de la señal proporcionada por el segundo anticuerpo o por provocar la modificación de las propiedades del anticuerpo primario.¹³⁷ Otra alternativa que permite disminuir la duración del ensayo es la adición del anticuerpo primario y el secundario simultáneamente, pudiéndose obtener ensayos con una sensibilidad similar al ensayo de dos etapas consecutivas.^{138,139}

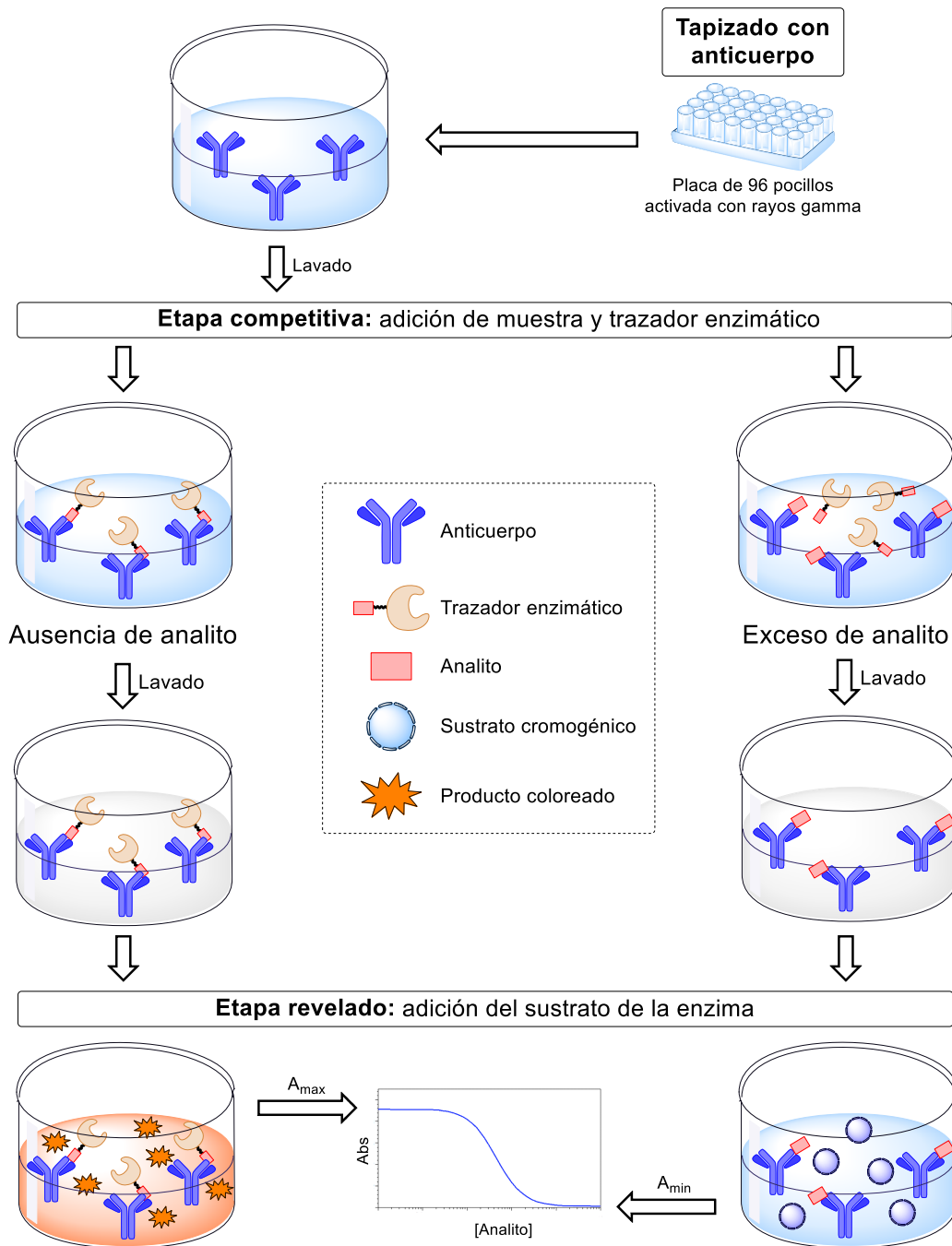


Figura 1.16. ELISA competitivo en formato directo o de anticuerpo inmovilizado.

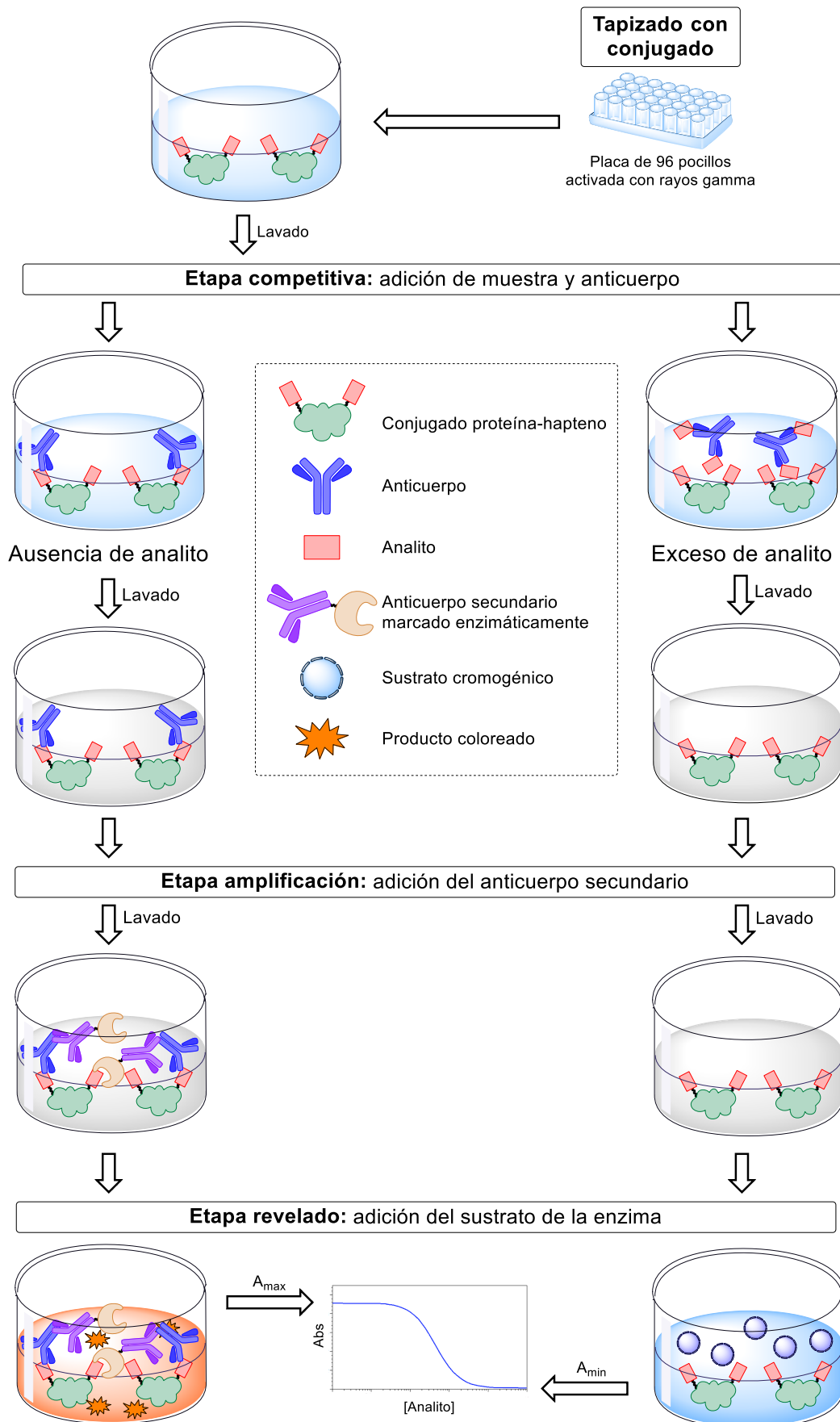


Figura 1.17. ELISA competitivo en formato indirecto o de conjugado inmovilizado.

1.3.4.2 LFIA. Tiras inmunorreactivas

Los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA, *Lateral Flow ImmunoAssay*) representan otra variedad de métodos inmunoanalíticos ampliamente utilizada en el campo del diagnóstico clínico y en seguridad alimentaria.^{140,141} Este tipo de técnicas destacan por su simplicidad y rapidez, además de ser fácilmente aplicables en análisis de campo. Estos métodos no requieren etapas de lavado, y son más fácilmente adaptables que el ELISA al análisis cualitativo de varios analitos.

Los cuatro componentes básicos (Figura 1.18) de un LFIA son la almohadilla de muestra, la almohadilla de conjugado, la membrana y la almohadilla absorbente. Estos componentes se ensamblan sobre un soporte plástico para dar lugar a la tira inmunorreactiva, que suele incluirse en el interior de un estuche con 2 ventanas, una para la adición de la muestra y otra para la visualización del resultado. Este tipo de ensayos suelen emplearse en posición horizontal para facilitar la migración de los inmunorreactivos. No obstante, la tira inmunorreactiva puede emplearse en vertical prescindiendo incluso de la almohadilla de conjugado.¹⁴² Además, se ha de señalar que en este tipo de ensayos el término conjugado hace referencia tanto al conjugado proteína–hapteno que se inmoviliza en la membrana, como al conjugado resultante de acoplar el anticuerpo con una entidad señalizadora, habitualmente una nanopartícula coloreada (NP).

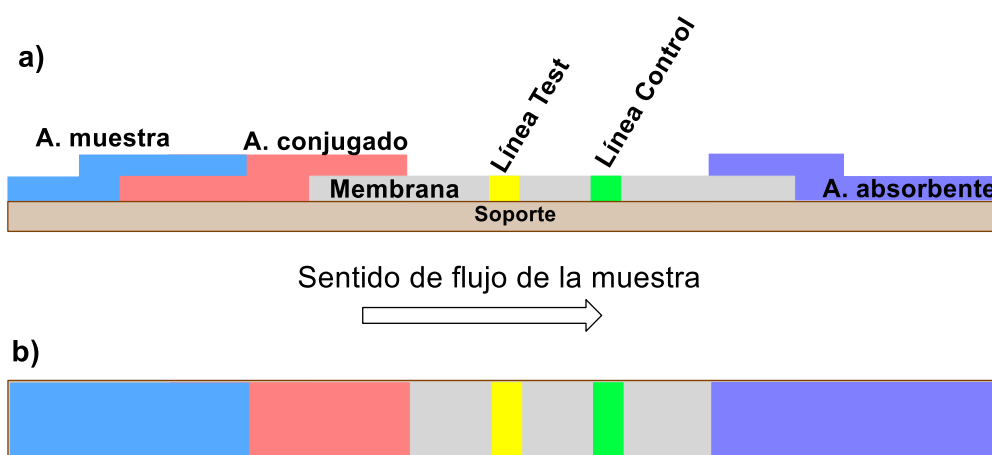


Figura 1.18. a) Vista lateral y b) vista frontal de una tira inmunorreactiva.

En el caso de analitos de bajo peso molecular, y al igual que ocurría en el ELISA, este tipo de ensayos también ha de ser de tipo competitivo. El conjugado proteína–hapteno competidor se inmoviliza en la membrana, dando lugar a la línea test (LT), mientras que el anticuerpo marcado se encuentra absorbido en la almohadilla de conjugado. La adición de una muestra líquida en la almohadilla de muestra provocará la migración por capilaridad de todos los componentes hacia la almohadilla absorbente. La interacción del anticuerpo con el conjugado proteína–hapteno inmovilizado en la LT dará lugar a una señal más o menos intensa en función de la concentración de analito. Adicionalmente, se incluye una línea control (LC), normalmente un anticuerpo

secundario capaz de reconocer al anticuerpo de ensayo, que retendrá el conjugado NP@mAb que no haya interactuado con la LT, y que permite verificar que el ensayo ha funcionado correctamente. Esta configuración dará lugar a un patrón de bandas diferente en función de si la muestra contiene analito o no (Figura 1.19).

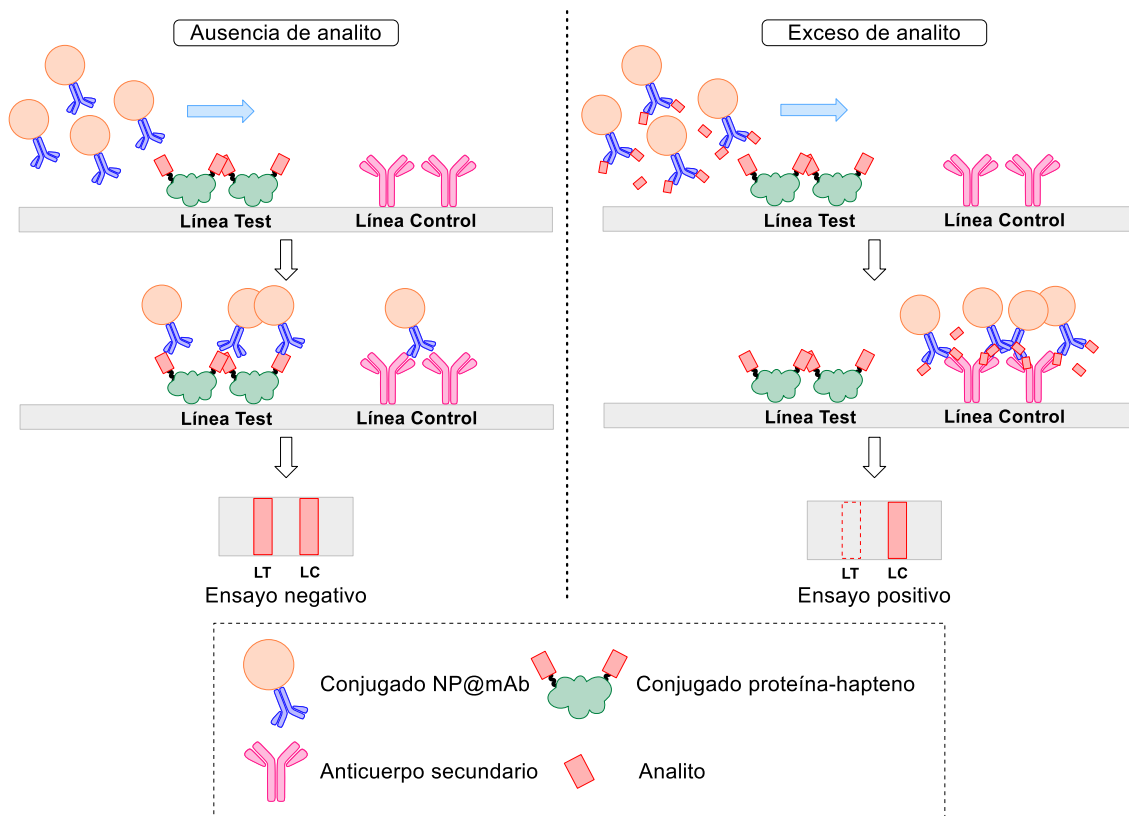


Figura 1.19. LFIA en formato competitivo empleado para moléculas de bajo peso molecular.

La porosidad de la membrana, y la naturaleza y tamaño de la nanopartícula empleada, además de la concentración del anticuerpo y su afinidad hacia el analito diana, son factores determinantes en la sensibilidad de este tipo de ensayo. El material más empleado para la preparación de membranas es la nitrocelulosa. Su porosidad condiciona el tiempo de ensayo, de forma que un tamaño de poro mayor dará lugar a una migración de reactivos más rápida, mientras que un tamaño de poro menor dará lugar a un ensayo más lento. Se define el flujo capilar como el tiempo en segundos que necesita la muestra para recorrer cuatro centímetros de membrana; así pues, se puede hablar de membranas rápidas cuando este parámetro es inferior a 100 y lentas cuando es superior a 150. En el caso de un ensayo competitivo, una velocidad de migración más lenta supondrá tiempos de interacción más largos entre el conjugado NP@mAb y el conjugado proteína-hapteno presente en la LT, lo que suele traducirse en un descenso de la sensibilidad.

Por otra parte, otro factor que influye en la sensibilidad de las tiras inmunorreactivas es la entidad seleccionada para generar la señal. El tamaño de la nanopartícula empleada es

determinante, ya que partículas de mayor tamaño serán más visuales y a su vez permitirán la inmovilización de más moléculas de anticuerpo por nanopartícula, hecho que en un principio perjudicará la sensibilidad del ensayo competitivo. En cuanto a la naturaleza de la nanopartícula, a lo largo de los años se han empleado una gran variedad de materiales. Algunos ejemplos son las nanopartículas de plata, selenio, carbono u oro, siendo estas últimas las más empleadas hoy en día.¹⁴³ Otras alternativas incluyen el uso de *quantum dots* (QD), nanopartículas de látex coloreadas o incluso fluorescentes.¹⁴⁴ Las nanopartículas de oro son las más empleadas debido a su estabilidad y variedad en cuanto a tamaño y facilidad de síntesis, además de permitir varias vías de inmovilización de biomoléculas. La más utilizada se basa en la gran afinidad que presentan los grupos tiol hacia el oro, formando interacciones no covalentes altamente estables. Así pues, la mezcla directa de las NPs con el anticuerpo a inmovilizar permitirá su adsorción pasiva o fisisorción a través de los grupos tiol de los residuos de cisteína presentes en su estructura. Además, al igual que en el ELISA competitivo directo, una inmovilización previa de un anticuerpo secundario de captura permite asegurar la disponibilidad del anticuerpo de ensayo. Una segunda aproximación que permite la quimisorción de proteínas es el uso de NPs modificadas que presenten grupos funcionales en su superficie que permitan la formación de enlaces covalentes aprovechando los residuos de aminoácidos del propio anticuerpo.

Tal y como se muestra en la Figura 1.19, y debido a la naturaleza competitiva de este tipo de ensayos, a medida que aumenta la concentración de analito, la intensidad de la señal en la LT disminuye, y cabría esperar un aumento de la intensidad en la LC. No obstante, la relación entre ambas señales está condicionada por las condiciones de ensayo y, especialmente, por la afinidad del anticuerpo hacia el conjugado proteína–hapteno inmovilizado. En función del patrón de líneas obtenido podemos encontrar tiras inmunorreactivas basadas únicamente en la intensidad de la LT^{145,146} o bien en la relación entre la intensidad de la LT y la intensidad de la LC (LT/LC).^{147,148} Por último, este tipo de inmunoensayos permite establecer un límite de detección visual (vLOD), definido como la concentración mínima necesaria para obtener una señal visualmente distinguible del cero analítico.

1.3.5 Optimización de la sensibilidad: uso de haptenos heterólogos

Existen distintos parámetros que afectan a la sensibilidad de un inmunoensayo competitivo, como la concentración de inmunorreactivos, los tiempos y temperaturas de incubación de las diferentes etapas o variables fisicoquímicas como el pH y la fuerza iónica. No obstante, la estrategia que suele proporcionar los mejores resultados a la hora de mejorar la sensibilidad es lo que se conoce como heterología de hapteno, es decir, el uso de conjugados

competidores en los que el hapteno no es el mismo que el que se empleó durante la generación del anticuerpo. Dado que es de esperar que la constante de asociación hacia un hapteno heterólogo sea más baja que hacia el hapteno homólogo, se formará una mayor cantidad de complejo anticuerpo–analito con respecto al ensayo homólogo bajo las mismas condiciones. Este desplazamiento de los equilibrios en juego dará lugar a un aumento aparente de la constante de asociación con el analito, lo que resultará en un menor valor de IC_{50} y, por tanto, en una mayor sensibilidad del inmunoensayo con respecto al ensayo homólogo bajo las mismas condiciones (Figura 1.20).

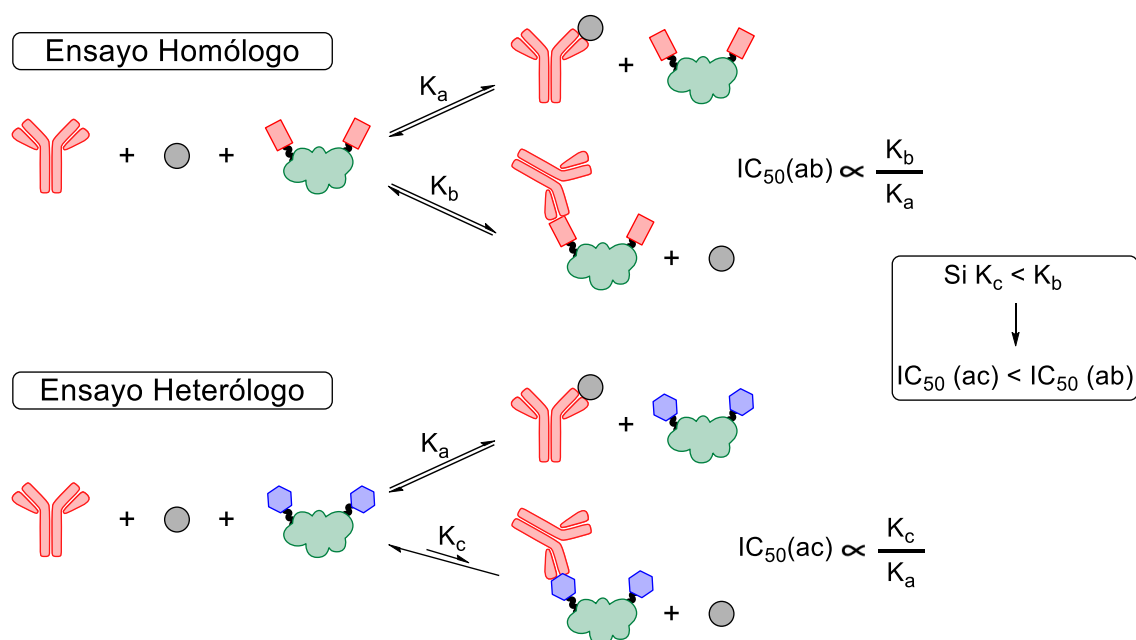


Figura 1.20. Equilibrios de reconocimiento molecular anticuerpo–analito y anticuerpo–conjugado en inmunoensayos competitivos homólogo y heterólogo.

En principio, cuanto más difiera el hapteno heterólogo del hapteno homólogo, menor será la afinidad del anticuerpo hacia él y más sensible puede llegar a ser el ensayo. Sin embargo, si dicha afinidad fuese excesivamente baja, hasta el punto de que el conjugado dejara de ser reconocido, no se obtendría señal y, por lo tanto, no existiría ensayo. Al igual que ocurre con el hapteno inmunizante, no es sencillo predecir la estructura ideal del hapteno competidor, por lo que es recomendable explorar diversos compuestos que puedan actuar como haptenos heterólogos. Las estrategias más frecuentes para preparar haptenos de este tipo implican cambios en la posición del brazo espaciador (heterología de posición),¹⁴⁹ cambios en la longitud o estructura de este (heterología de brazo espaciador)¹⁵⁰ o incluso leves modificaciones en el esqueleto del analito (generalmente adición, variación o eliminación de grupos funcionales).¹⁵¹

1.3.6 Desarrollo del inmunoensayo

Una vez seleccionadas las parejas de anticuerpo y conjugado más adecuadas, es necesario llevar a cabo la optimización de parámetros como pH, fuerza iónica (I), temperatura o tiempos de incubación, con el objetivo de optimizar sus valores y así mejorar la sensibilidad del ensayo.

Una vez se han definido estos parámetros, el siguiente paso es comprobar la aplicabilidad del ensayo en matrices en las que potencialmente se pueda encontrar el analito diana. Para ello, la aproximación más sencilla es el análisis de muestras fortificadas con una concentración conocida del analito, lo que permite determinar la exactitud y precisión del ensayo desarrollado. No obstante, es común que a la hora de analizar muestras reales se observen interferencias relacionadas con la naturaleza de las mismas, hecho conocido como efecto matriz. En estos casos es necesario un tratamiento de la muestra que permita eliminar dichas interferencias y así facilitar la correcta detección del analito objetivo. En el caso de muestras líquidas, y dada la elevada especificidad de la interacción Ab–Ag, con frecuencia una simple dilución en tampón de ensayo es suficiente para la eliminación de este efecto matriz. No obstante, para el caso de matrices sólidas y/o más complejas, suele ser necesario recurrir a extracciones con tampón o disolventes orgánicos. Por este motivo, también se suele llevar a cabo un estudio sobre la influencia de disolventes orgánicos.

1.3.7 Antecedentes inmunoquímicos de ocratoxina A

Tal y como se ha ido comentando a lo largo de las secciones previas, a pesar de que OTA es un analito ampliamente estudiado en el área de la inmunodetección, siempre se ha empleado la misma aproximación a la hora de generar anticuerpos frente a él: el uso del grupo carboxilo de su estructura para la preparación de conjugados, tanto de inmunización como de ensayo.

En este sentido, en 1975 se describieron los primeros pAbs para OTA, con una IC_{50} de alrededor de 80 ng/mL.⁹¹ Sin embargo, no fue hasta 1986 cuando se describieron los primeros mAbs, con una IC_{50} similar.¹⁵² Desde entonces, han sido muchos los autores que han descrito la generación de anticuerpos contra OTA empleando la misma aproximación (Tabla 1.5).

Los primeros mAbs producidos con una IC_{50} inferior a 1 ng/mL fueron descritos por Kawamura y colaboradores. No obstante, todos los anticuerpos generados por este grupo mostraron una elevada reactividad cruzada hacia OTC.¹⁵³ En el caso de pAbs, el grupo de Clarke obtuvo en 1995 afinidades y especificidades similares con antisueros de conejo.¹⁵⁴ Desde entonces, los valores de IC_{50} de la mayoría de los anticuerpos descritos se han encontrado entre 0.5 y 10 ng/mL. Cabe destacar los pAbs producidos por el grupo de Wang¹⁵⁵ y el mAb obtenido por Li y

colaboradores,¹⁵⁶ ambos con IC₅₀ por debajo de 0.1 ng/mL. Más recientemente, el grupo de Elliot obtuvo mAbs con afinidades similares.¹⁵⁷ Sin embargo, a pesar de la elevada afinidad hacia OTA de los anticuerpos descritos en estas publicaciones, en ninguno de ellas se evalúa el reconocimiento hacia OTC.

Tabla 1.5. Principales publicaciones en las que se describe la obtención *de novo* de anticuerpos contra OTA.

Año	Tipo Ab	IC ₅₀ (ng/mL)	Ref.	Año	Tipo Ab	IC ₅₀ (ng/mL)	Ref.
1975	pAb	80.0	91	2011	mAb	10.0	158
1976	pAb	20.0	159	2011	mAb	1.7	160
1981	pAb	4.0	161	2011	mAb	0.08	90
1986	mAb	50.0	152	2012	mAb	0.5	162
1987	mAb	2.5	163	2012	mAb	2.0	92
1989	mAb	0.4	153	2012	mAb	27.0	95
1993	pAb	9.0	164	2013	mAb	0.5	140
1995	pAb	0.7	154	2013	mAb	0.06	156
1996	mAb	0.5	165	2014	rAb	0.3	166
1996	mAb	0.5	167	2015	mAb	0.2	168
2000	pAb	5.0	169	2015	mAb	-	170
2004	mAb	30.0	171	2015	mAb	7.6	172
2005	mAb	1.2	173	2016	pAb	6.0	174
2005	pAb	0.9	175	2016	mAb	0.2	145
2006	mAb	0.3	176	2017	pAb	0.7	177
2006	pAb	0.8	178	2017	mAb	0.2	157
2006	pAb	1.0	179	2017	mAb	0.1	180
2007	pAb	0.07	155	2017	rAb	20.0	181
2008	rAb	12.0	182	2018	mAb	0.8	183
2008	mAb	0.3	184	2018	mAb	2.6	185
2009	mAb	1.0	186	2019	mAb	0.4	187
2009	mAb	0.4	188				

En este sentido, cuando se evalúa la afinidad hacia las otras dos ocratoxinas que componen esta familia, los valores descritos son muy variados, aunque un patrón común es una baja afinidad hacia OTB y una alta afinidad hacia OTC. Algunas excepciones son los anticuerpos obtenidos por los grupos de Lei y Zhang, los cuales muestran una capacidad de reconocimiento similar hacia las tres micotoxinas que forman esta familia.^{177,183}

El número de rAbs descritos hasta la fecha es considerablemente inferior. Dos de las publicaciones están basadas en el dominio variable de cadenas pesadas (V_HH), también denominados *nanobodies*, obtenidos en alpaca (*Vicugna pacos*). Los primeros anticuerpos de este tipo fueron descritos en 2008 por el grupo de Beekwilder, con los que desarrollan un ELISA indirecto con un valor de IC₅₀ de 12.0 ng/mL y LODs próximos a 20 ng/mL en vino y café.¹⁸² En 2014, el grupo de Hammock obtuvo varios anticuerpos de este tipo, mostrando el mejor de ellos un valor de IC₅₀ de 0.3 ng/mL.¹⁶⁶ Otro ejemplo es el descrito por Tullila y colaboradores, que obtienen rAbs basados en el fragmento Fab de anticuerpos de ratón. Este grupo emplea como inmunógeno un

conjugado basado en OTB para obtener rAs con una IC_{50} de aproximadamente 20 ng/mL hacia OTA.¹⁸¹

La variedad de formatos y matrices analizadas de los ensayos recogidos en la Tabla 1.5 también es muy amplia. Los grupos de Poulsen y Rousseau desarrollaron radioinmunoensayos basados en ^{125}I y ^{14}C , respectivamente.^{91,163} Shim y colaboradores describieron en 2004 un ensayo basado en fluorescencia polarizada empleando un derivado de OTA marcado con fluoresceína para el análisis de cebada, alcanzando un LOD de 3.0 ng/mL.¹⁷¹ Otro ejemplo de este tipo de inmunoensayo es el descrito por Zezza y colaboradores; este grupo obtiene dos anticuerpos monoclonales con baja afinidad hacia el trazador fluorescente, también basado en el aducto OTA-fluoresceína, por lo que acaban desarrollando un ensayo de fluorescencia polarizada empleando anticuerpos comerciales con un LOD de 0.7 ng/mL en vino, previa limpieza de la muestra con una columna de SPE.¹⁸⁸ Además, existen una gran variedad de inmunoensayos basados en anticuerpos comerciales que emplean la fluorescencia como vía de detección, desde los que emplean sustratos que dan lugar a productos fluorescentes,¹⁸⁹ pasando por el uso de *quantum-dots*,¹⁹⁰ hasta los basados en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET).¹⁹¹ Por otra parte, también se ha hecho uso de sustratos quimioluminiscentes, como el luminol, para el desarrollo de inmunoensayos para OTA. A modo de ejemplo, podemos citar el desarrollado por el grupo de Sakharov, un ELISA directo con una IC_{50} de 0.08 ng/mL, sensibilidad muy superior a la que obtienen cuando emplean TMB como sustrato ($IC_{50} = 0.6$ ng/mL).⁹⁰ Otros ejemplos de inmunoensayos quimioluminiscentes implican el uso de *chips* o de nanopartículas magnéticas.^{192,193} Un ejemplo de columna de inmunoafinidad que emplea mAbs generados *de novo* es la descrita por el grupo de Miyake. Este grupo aprovecha la alta tolerancia a metanol de sus anticuerpos para extraer OTA de varias matrices y analizarla posteriormente mediante ELISA.⁹⁵ No obstante, a pesar de la gran variedad de sistemas existentes, los inmunoensayos que gozan de una mayor aplicación en el ámbito de OTA son los métodos ELISA y las tiras inmunorreactivas. Ambas técnicas han sido ampliamente aplicadas para el análisis de café, vino o cereales.^{90,156,158,160,180}

Por otra parte, muchos autores han empleado anticuerpos comerciales para el desarrollo de inmunosensores electroquímicos para la detección de OTA en muestras como vino o café.^{194–196} Este tipo de ensayos están basados en el uso de electrodos sobre los que se inmoviliza uno de los inmunorreactivos, para posteriormente llevar a cabo la detección de OTA sobre su superficie mediante cambios en la corriente. Otro ejemplo de inmunosensores aplicados a la detección de esta micotoxina son los basados en las microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM, *quartz crystal microbalance*), que son capaces de detectar variaciones de masa por unidad de superficie.^{197,198} Un ejemplo de aplicación de este tipo de sensores a muestras de vino es el del grupo de Karczmarczyk,

que emplean nanopartículas de oro marcadas con anticuerpo secundario para producir una mayor variación de masa y así alcanzar una IC_{50} de 2.5 ng/mL y un LOD en vino de 0.16 ng/mL.¹⁹⁹ Por último, además de las ya mencionadas QCM, existen una gran variedad de inmunosensores basados en *chips*.²⁰⁰⁻²⁰² Un ejemplo es el descrito por el grupo de Anal, basado en un chip de SPR para la detección de OTA en café, alcanzando un LOD de 3.8 ng/mL.⁹⁶

Por último, alternativas a los anticuerpos incluyen el uso de aptámeros, oligonucleótidos de cadena sencilla preparados *in vitro*, o MIPs, polímeros de impresión molecular. El primer aptámero para la detección de OTA fue desarrollado en 2008 por Cruz-Aguado y Penner para la preparación de una columna de afinidad destinada a la extracción de OTA en trigo.²⁰³ Desde entonces, pocos autores más han reportado nuevos aptámeros contra esta micotoxina.^{75,204} No obstante, su aplicación ha sido casi tan variada como para el caso de los anticuerpos; se han desarrollado métodos similares al ELISA,⁷⁵ ensayos basados en quimioluminiscencia,²⁰⁵ FRET con *quantum dots*,²⁰⁶ fluorescencia polarizada²⁰⁷ o incluso ensayos de flujo lateral.²⁰⁸ Por su parte, son varios los autores que han descrito la preparación de MIPs específicos para OTA,^{72,209-211} existiendo incluso columnas comerciales basadas en esta tecnología.^{77,81,212,213}

2. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como principal objetivo la generación de anticuerpos de elevada afinidad contra ocratoxina A a partir de conjugados proteicos preparados por aproximaciones alternativas a la vía convencional, la cual utiliza el grupo carboxilo presente en la estructura de esta micotoxina para su acoplamiento a proteínas. Los anticuerpos y conjugados proteicos obtenidos mediante estas nuevas aproximaciones se emplearán en el desarrollo de métodos inmunoanalíticos que permitan la detección de ocratoxina A en alimentos, en especial vino y zumo de uva, a los niveles establecidos en la legislación europea. Para conseguir este objetivo general, en esta Tesis Doctoral se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño y síntesis de análogos funcionalizados de ocratoxina A (haptenos) mediante la introducción de un brazo espaciador en posiciones alternativas al grupo carboxilo nativo.
 - 1.1 Diseño de un nuevo procedimiento sintético para la preparación de ocratoxina α con mejores rendimientos a los previamente descritos.
 - 1.2 Diseño y síntesis de haptenos con un brazo espaciador carboxilado en posiciones alternativas al grupo carboxilo nativo de ocratoxina A para su conjugación a proteínas mediante química mediada por carbodiimidas.
 - 1.3 Diseño y síntesis de haptenos con un brazo espaciador funcionalizado con un grupo azida en posiciones alternativas al grupo carboxilo nativo de ocratoxina A para su conjugación a proteínas a través de química “click”.
2. Preparación de conjugados proteína–hapteno por unión covalente de los haptenos sintetizados a diversas proteínas transportadoras, con o sin actividad enzimática.

- 2.1 Preparación de conjugados proteína–hapteno vía formación de un enlace amida a través del grupo carboxilo incluido en el brazo espaciador de los haptenos.
- 2.2 Preparación de conjugados proteína–hapteno a través de una cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I), a través del grupo azida incluido en el brazo espaciador de los haptenos.
3. Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a ocratoxina A.
 - 3.1 Evaluación de la respuesta inmune de diferentes conjugados proteína–hapteno mediante la producción de anticuerpos policlonales de conejo.
 - 3.2 Generación de una colección de anticuerpos monoclonales de ratón capaces de reconocer ocratoxina A con una elevada afinidad y especificidad.
4. Desarrollo de inmunoensayos en formato ELISA basado en los anticuerpos monoclonales generados.
5. Desarrollo de tiras inmunorreactivas basadas en los anticuerpos monoclonales generados.
6. Aplicación de los inmunoensayos desarrollados al análisis de ocratoxina A en muestras de vino y zumo de uva. Determinación de la exactitud y precisión de los métodos desarrollados.
7. Evaluación de kits ELISA y tiras inmunorreactivas comerciales destinados a la detección de ocratoxina A en muestras de vino y comparación con los ensayos desarrollados.

OBJECTIVES

The main purpose of this Thesis is the generation of high affinity antibodies against ochratoxin A using protein conjugates prepared by alternative methods to the classical approach, which uses the native carboxylic group present in the structure of this mycotoxin for its coupling to proteins. These antibodies and the protein conjugates will be used in the development of immunoassays for the detection of ochratoxin A in wine and grape juice at the maximum legal limits established by the European regulation. In order to accomplish these aims, the following goals were addressed:

1. Design and synthesis of functionalised analogous of ochratoxin A (haptens) with the spacer arm at alternative positions to the native carboxylic group.
 - 1.1 Design of a novel synthetic route for the preparation of ochratoxin α with a higher yield than the previously reported procedures.
 - 1.2 Design and synthesis of haptens with a carboxylated spacer arm at alternative positions to the native carboxylic group of ochratoxin A for their conjugation to proteins by carbodiimide-assisted chemistry.
 - 1.3 Design and synthesis of haptens with an azide-functionalised spacer arm at alternative positions to the native carboxylic group of ochratoxin A for their conjugation to proteins by click chemistry.
2. Preparation of protein–hapten conjugates by covalent coupling of the synthesised haptens to different proteins, with and without enzymatic activity.
 - 2.1 Preparation of protein–hapten conjugates by the formation of an amide bond through the carboxylic group included in the haptens.

- 2.2 Preparation of protein–hapten conjugates by a copper (I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition reaction through the azide group included in the haptens.
3. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against ochratoxin A.
 - 3.1 Evaluation of the immune response in rabbits by generation of polyclonal antibodies with every protein–hapten conjugate.
 - 3.2 Production of mouse monoclonal antibodies with high affinity and specificity towards ochratoxin A.
4. Development of an ELISA based on the generated monoclonal antibodies.
5. Development of an immunostrip based on the generated monoclonal antibodies.
6. Application of the developed assays for the detection of ochratoxin A in wine and grape juice samples and assessment of their precision and accuracy.
7. Evaluation of commercial ELISA kits and immunostrips for the detection of ochratoxin A in wine samples and comparison with the assays developed in this Thesis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DISEÑO DE HAPTENOS

El desarrollo de inmunoensayos para compuestos de bajo peso molecular comienza con el diseño y la síntesis de haptenos. La capital importancia de esta etapa radica en el hecho de que la afinidad y la especificidad de los anticuerpos generados, y por lo tanto las prestaciones analíticas de los inmunoensayos desarrollados a partir de ellos, dependen de la estructura del hapteno empleado como inmunógeno. El diseño de haptenos debe realizarse tomando como criterio que el derivado funcionalizado mantenga, en la medida de lo posible, las características fisicoquímicas de la molécula original, maximizando la similitud estérica y electrónica, así como la geometría espacial de su estructura química. En este sentido, y tal como se expuso en la sección 1.3.1 de la introducción, un hapteno adecuado debería preservar la integridad de la estructura y los grupos funcionales del analito diana, incorporando el brazo espaciador en posiciones que provoquen las mínimas perturbaciones en la distribución electrónica y conformacional.

Tal y como se ha descrito previamente, para el caso de OTA son muchas las publicaciones en las que se describe la producción de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, así como el desarrollo de inmunoensayos. Sin embargo, en todas ellas la estrategia utilizada para la preparación de los conjugados ha sido siempre la misma: el uso del grupo carboxilo nativo de esta micotoxina para la conjugación a la proteína portadora. Esta aproximación, empleada principalmente debido a su simplicidad, puede no ser la más adecuada desde un punto de vista inmunológico.

A pesar del elevado grado de madurez que ha alcanzado lo que podríamos denominar “inmunoquímica de haptenos”, el diseño del “hapteno ideal” sigue siendo todavía un reto. Dado que la inmunización con un único hapteno no garantiza la producción de los anticuerpos con las características analíticas deseadas, en muchas ocasiones es conveniente la preparación de varios de ellos para un mismo compuesto objetivo. Esta estrategia permite la exposición de la estructura del analito al sistema inmunitario desde orientaciones complementarias, aumentando la probabilidad de generar anticuerpos de alta afinidad. Además, el uso de distintas aproximaciones facilita la obtención de anticuerpos con características de selectividad variables frente a análogos estructurales del analito diana. Una ventaja adicional de esta estrategia es la disponibilidad de haptenos heterólogos para la posterior mejora de la sensibilidad de los inmunoensayos.

3.1.1 Diseño y análisis retrosintético de haptenos para ocratoxina A

Teniendo en cuenta las premisas generales para el diseño de haptenos y con el objetivo de que estos mantengan libre el grupo carboxilo presente en la estructura de OTA, se decidió preparar dos derivados, situando en cada uno ellos el brazo espaciador en posiciones distales a dicho grupo carboxilo (Figura 3.1). En ambos casos, el brazo espaciador estuvo constituido por una cadena hidrocarbonada de cinco o seis átomos de carbono finalizada en un grupo funcional para la posterior conjugación a las correspondientes proteínas transportadoras. Para lograr la mejor exposición al sistema inmune de los grupos más polares de esta micotoxina, uno de los haptenos se diseñó de forma que incluyera el brazo espaciador en la posición 4 del grupo fenilo del resto de Phe, mientras que en el otro hapteno el brazo espaciador se incorpora como una homologación del grupo metilo presente en el C-3' del anillo de dihidroisocumarina, para así exponer en mayor medida la parte de la molécula en la que se encuentra el residuo de Phe y su grupo carboxilo. Para evaluar la eficacia de la estrategia propuesta y de la hipótesis que la sustenta, se decidió preparar, a modo de control, dos haptenos adicionales: el primero de ellos es la propia OTA, la cual puede ser acoplada a proteínas mediante la ya descrita aproximación convencional, es decir, empleando el grupo carboxilo nativo de la misma; el segundo hapteno control incorpora un brazo espaciador en el grupo carboxilo nativo con la intención de posibilitar una mejor proyección desde la proteína portadora durante la respuesta inmune.

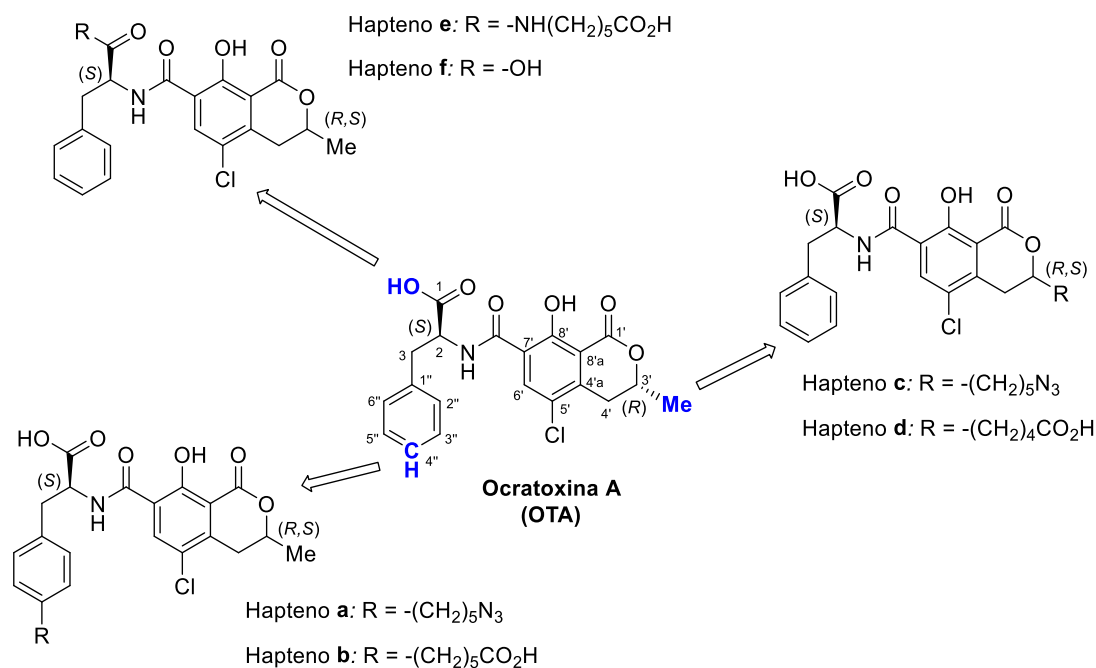


Figura 3.1. Haptenos propuestos para OTA.

Todos los haptenos propuestos presentan el esqueleto completo de OTA, el cual se preparó mediante el acoplamiento de derivados de Phe y OT α debidamente funcionalizados. La estrategia concreta en cada caso, incluyendo el orden de ensamblaje de los distintos sintones, condicionó la naturaleza y funcionalización previa de los distintos precursores empleados.

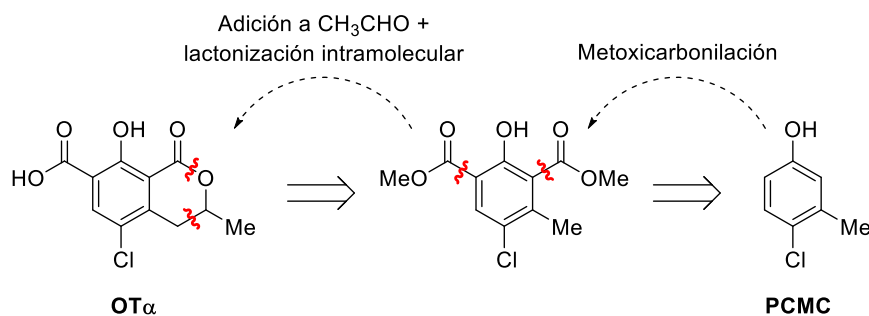
A pesar de que los 6 haptenos fueron conceptualmente concebidos de forma simultánea, se comenzó sintetizando aquellos cuya conjugación se basaría en la formación de un enlace amida mediado por carbodiimidas (haptenos **b**, **d**, **e** y **f**), por tratarse de una aproximación química más desarrollada y que habitualmente utilizamos en nuestro grupo de investigación, con el objetivo de comenzar evaluando el efecto del grupo carboxilo nativo de la estructura de OTA sobre la respuesta inmune. Posteriormente, se procedió a la preparación de los haptenos basados en el grupo azida (haptenos **a** y **c**) con el objetivo de evaluar la viabilidad de la producción de anticuerpos de elevada afinidad hacia OTA empleando conjugados proteicos preparados a través de una reacción CuAAC, aproximación no descrita hasta la fecha para analitos de bajo peso molecular. En principio, la presencia del grupo azida en el extremo del brazo simplificaría la ruta sintética a la hora de preparar análogos de OTA en los que el grupo carboxilo nativo se encuentra libre, como son los haptenos **b** y **d**. Además, la validación de esta estrategia permitiría su aplicación a otros analitos con grupos carboxilos difícilmente compatibles con las vías clásicas de conjugación, como son fluoroquinolonas, estatinas o incluso otras micotoxinas como las fumonisinas, por nombrar solo algunos analitos potenciales.

Hay que señalar que, aunque OTA es un compuesto enantioméricamente puro, la preparación de todos los haptenos se planteó de forma racémica por su mayor simplicidad sintética. Así, mientras que la estereoquímica absoluta del estereocentro del resto de (2S)-fenilalanina se mantiene en todos los haptenos, la preparación del fragmento de dihidroisocumarina, que en OTA presenta la estereoquímica *R* en C-3', se llevó a cabo en todos los casos en forma racémica. Obviamente, el uso del fragmento de OT α en forma racémica da lugar a mezclas diastereoisoméricas de los haptenos, *i.e.*, mezclas equimoleculares de los diastereoisómeros (2S,3*R*') y (2S,3*S*'). Desde el punto de vista inmunológico este planteamiento no supone un serio inconveniente, ya que, aunque probablemente se producirán anticuerpos que se unirán preferentemente a cada diastereoisómero, la evaluación de afinidad frente a OTA siempre se realiza empleando el diastereoisómero (2S,3*Re y **f**, a pesar de que podría haberse empleado OTA natural para su preparación, se decidió aplicar la misma estrategia con el objetivo de disponer de controles con las mismas características configuracionales que el resto de haptenos.*

3.1.1.1 Síntesis de ocratoxina α

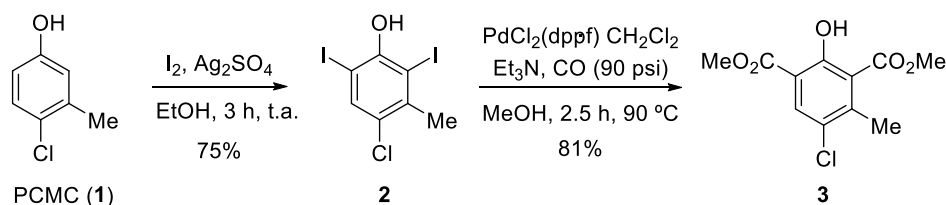
Como ya se ha señalado en varias ocasiones, la síntesis de los haptenos propuestos descansa en la preparación de uno de los metabolitos principales de OTA, OT α . En la sección 1.1.2 se han descrito varias aproximaciones sintéticas, tanto enantioselectivas como racémicas, para la preparación de esta estructura. Uno de los principales objetivos de esta Tesis fue la preparación de este metabolito a través de una ruta sintética que permitiese la incorporación de los brazos espaciadores de los haptenos **c** y **d** mediante modificaciones simples de la misma, además de que fuese más eficaz que las descritas previamente.

La síntesis de este intermedio clave parte de 4-cloro-3-metilfenol, un producto fácilmente accesible conocido también como PCMC (*para*-cloro-*meta*-cresol), y que se utiliza como germicida y conservante en cosmética y en la fabricación de pinturas o cuero. La estrategia seguida para la transformación de este producto en OT α pasa por la doble metoxicarbonilación en alfa a la función fenólica, seguido de una condensación de la posición bencílica con acetaldehído y lactonización intramolecular que da lugar al anillo de dihidroisocumarina (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Análisis retrosintético del metabolito **OT α** .

La principal novedad de esta nueva estrategia reside en el método de preparación del intermedio dicarboxilado (Esquema 3.2). Para la síntesis de este intermedio fue necesario primero preparar el derivado diyodado **2**, el cual se obtuvo por yodación de PCMC (**1**) con I_2 , una reacción que es promovida por el catión plata y que se produce en condiciones suaves de forma eficaz en un tiempo de reacción corto. Una vez obtenido el compuesto **2**, se llevó a cabo la reacción de metoxicarbonilación de las posiciones yodadas para obtener la estructura **3**.²¹⁴ La reacción implica el tratamiento del derivado diyodado **2** con CO a presión en metanol, utilizando como catalizador el complejo de paladio [1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) con diclorometano ($PdCl_2(dppf) \cdot CH_2Cl_2$),ⁱ y permitió obtener el derivado dicarboxilado **3** con un excelente rendimiento global del 61%. El compuesto **3**, obtenido en dos etapas, se caracterizó espectroscópicamente vía RMN de 1H , obteniéndose señales coincidentes con las descritas en la literatura para el mismo.²⁹



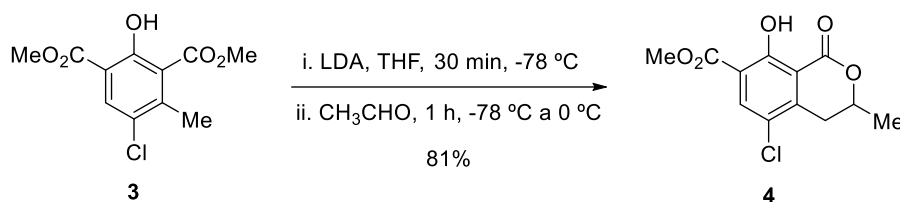
Esquema 3.2. Preparación del compuesto dicarboxilado **3** a partir del producto comercial PCMC (**1**).

Tal como se ha planteado en el esquema retrosintético (Esquema 3.1), la preparación del anillo de δ -lactona de **OT α** (Esquema 3.3) se abordó a través de un proceso de alquilación de la posición bencílica de **3** con acetaldehído y posterior ciclación intramolecular al anillo lactónico, un proceso análogo al empleado en la literatura (ver sección 1.1.2).

En esta etapa se empleó diisopropilamido de litio (LDA), preparado en THF anhidro a partir de butil litio y diisopropilamina, como base para generar el carbanión bencílico que reacciona

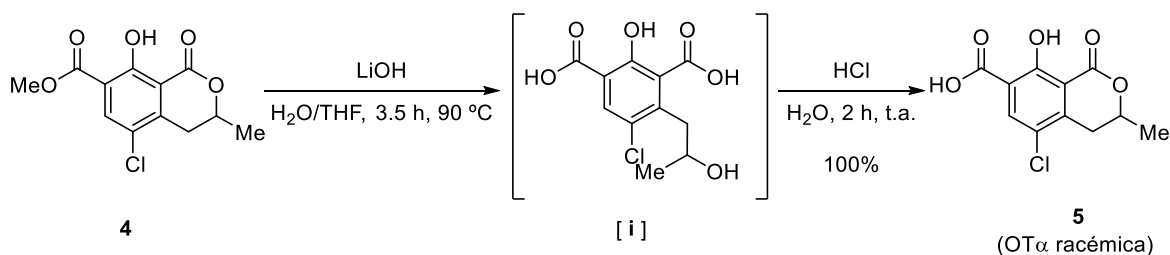
ⁱ En esta etapa del proceso sintético se ensayaron otros catalizadores basados en paladio (BINAP- $PdCl_2$ y $Pd[(PPh_3)]_4$), en busca de aquel que produjera el mejor rendimiento a la vez que se optimizaba el tiempo de reacción, obteniéndose siempre los mejores resultados con $PdCl_2(dppf) \cdot CH_2Cl_2$.

rápidamente con acetaldehído para formar un alcóxido tras la reacción de adición al carbonilo. Este sufre posteriormente una lactonización intramolecular a través de un proceso de adición-eliminación, obteniéndose, tras la correspondiente purificación cromatográfica, el producto **4**.



Esquema 3.3. Formación del anillo de δ -lactona a través de adición del carbanión bencílico de **3** a acetaldehído.

Finalmente, la preparación de OT α se completó mediante hidrólisis básica del éster metílico por tratamiento de **4** con LiOH en THF acuoso a reflujo, temperatura que resultó necesaria en este caso para posibilitar la solubilidad del éster inicial (Esquema 3.4). En estas condiciones se produjo la hidrólisis deseada del éster metílico, pero también la apertura del anillo lactónico, para generar el intermedio **i**, que no fue aislado. Directamente, la mezcla de reacción se acidificó con HCl acuoso y se mantuvo bajo agitación durante 2 h, lo que permitió la regeneración del anillo lactónico para proporcionar el producto deseado **5** (OT α racémica) con un rendimiento prácticamente cuantitativo. El compuesto **5** se obtuvo prácticamente puro, tal como indicaba su espectro de RMN de ^1H , por lo que se utilizó en la siguiente etapa sin purificar. También para este producto, las propiedades espectroscópicas obtenidas son plenamente coincidentes con las descritas en la bibliografía.^{28,29} El rendimiento global de la síntesis de OT α en su forma racémica a través de la ruta de 4 etapas aquí descrita es del 50%, rendimiento superior a los descritos previamente en la literatura, siendo el mejor de ellos del 41%, obtenido por el grupo de Glorius.³³

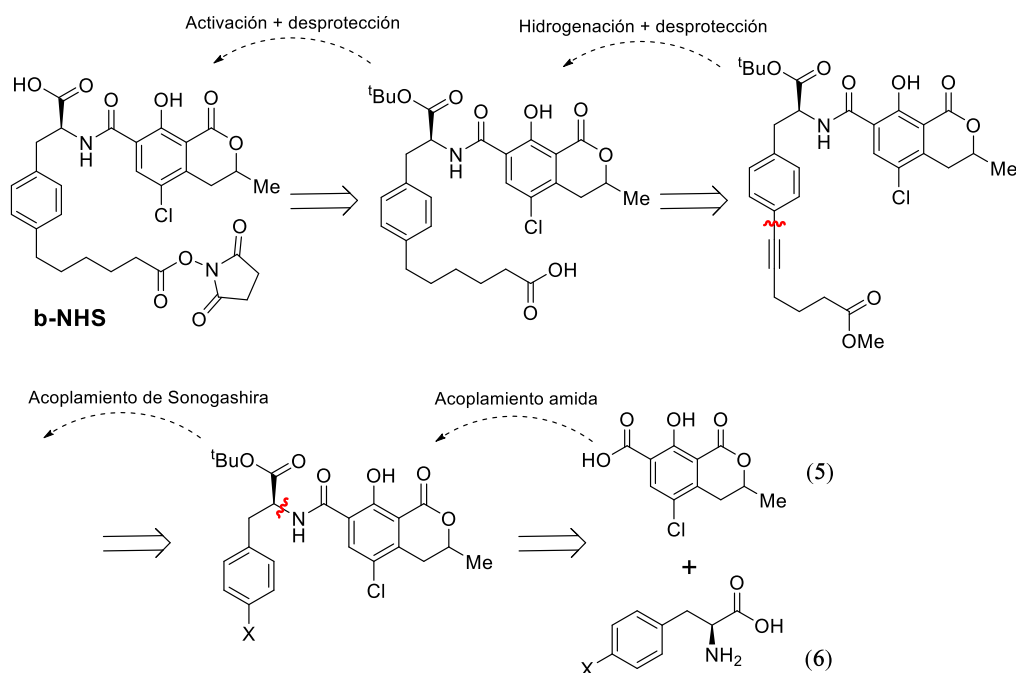


Esquema 3.4. Hidrólisis básica del éster metílico de **4** para la obtención de **5**.

3.1.1.2 Síntesis del hapteno **b**

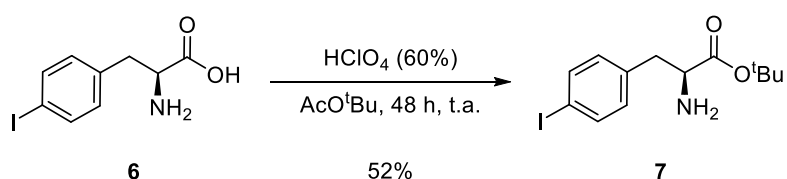
La preparación del hapteno **b** se planteó de acuerdo a la retrosíntesis representada en el Esquema 3.5. La introducción del brazo espaciador en la posición *para* del anillo de Phe se plantea a través de una reacción de acoplamiento C–C tipo Sonogashira, por lo cual se utiliza como equivalente sintético del fragmento de Phe el ácido comercial 2-amino-3-(4-yodofenil)propanoico (**6**). La presencia del grupo carboxilo propio de OTA, y el hecho de que el hapteno **b** se diseñara

con un grupo ácido en el extremo de su brazo espaciador, hace necesaria la protección del primero de ellos para así poder activar de forma selectiva el grupo carboxilo del brazo espaciador, para la posterior conjugación del hapteno a proteínas.



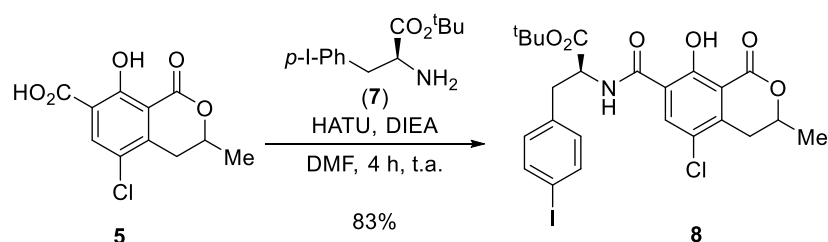
Esquema 3.5. Análisis retrosintético propuesto para el éster activo del hapteno **b** (**b-NHS**).

Como grupo protector se escogió el éster *tert*-butílico, un grupo que puede eliminarse para regenerar el correspondiente ácido en condiciones ácidas relativamente suaves. La transformación del aminoácido **6** en el correspondiente éster *tert*-butílico **7** se efectuó por tratamiento del primero con acetato de *tert*-butilo como reactivo y disolvente en presencia de ácido perclórico acuoso como catalizador (Esquema 3.6).²¹⁵



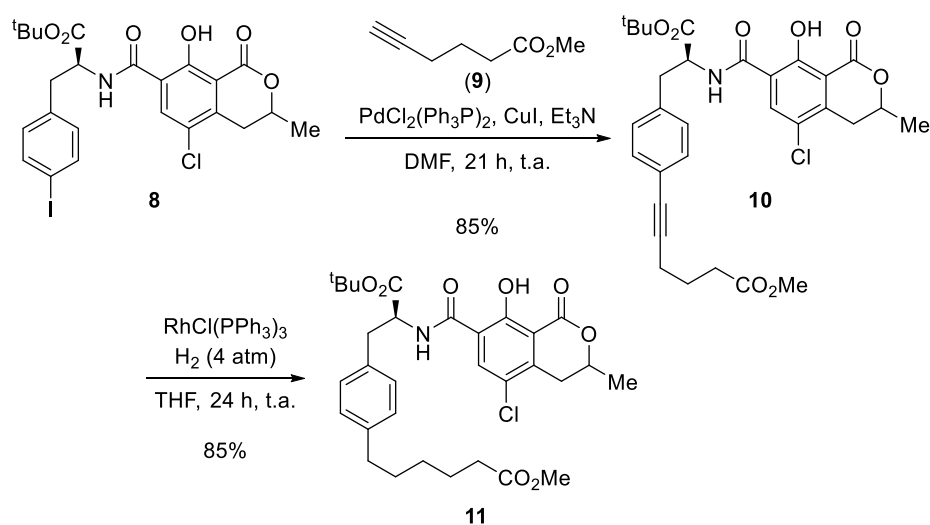
Esquema 3.6. Protección en forma de éster de *tert*-butilo del derivado de Phe **6** para la obtención del éster **7**.

Una vez preparado el derivado de Phe debidamente protegido, se procedió al acoplamiento con $\text{OT}\alpha$ mediante la formación de un enlace amida (Esquema 3.7). Para ello se empleó HATU, un agente de condensación ampliamente utilizado en la síntesis de péptidos y que también se ha utilizado en alguna de las síntesis de OTA previamente descritas.²⁹



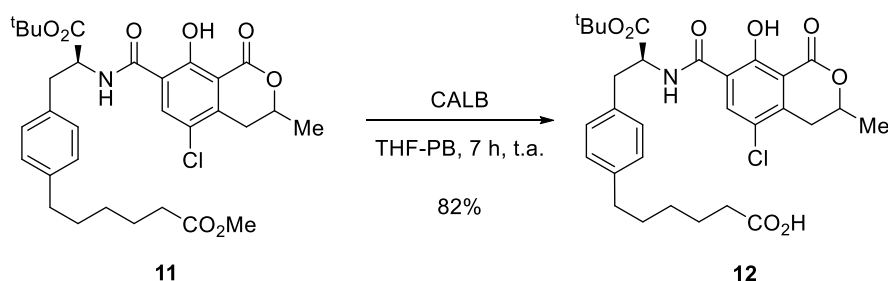
Esquema 3.7. Acoplamiento asistido por HATU entre **5** y el derivado de Phe **7** para la obtención del compuesto **8**.

Como producto de esta etapa se obtuvo el derivado yodado **8**, el cual posee la estructura molecular completa de la OTA y el átomo de yodo en el anillo aromático que permite la posterior introducción, vía reacción de Sonogashira, de la cadena hidrocarbonada adecuadamente funcionalizada para la obtención del hapteno **b**. La reacción de Sonogashira entre el yoduro **8** y 5-hexinoato de metilo (**9**), se llevó a cabo bajo las condiciones típicas para este tipo de acoplamiento, que habitualmente utilizan catalizadores que contienen especies de Cu(I) y Pd(II). En este caso se utilizaron CuI y PdCl₂(Ph₃P)₂ como catalizadores en una mezcla de DMF y Et₃N, que hace las veces de codisolvente y base. Aunque la reacción de acoplamiento requirió un tiempo de reacción largo, esta se produjo en condiciones suaves, proporcionado el producto de acoplamiento cruzado **10** con un excelente rendimiento. Una vez obtenido el producto de la reacción de Sonogashira, se procedió a la reducción del triple enlace mediante una reacción de hidrogenación en condiciones homogéneas, empleando el catalizador de Wilkinson RhCl(PPh₃)₃. La elección de estas condiciones estuvo motivada por el hecho de que con el uso de catalizadores más comunes en este tipo de hidrogenaciones se pudiera producir, al menos parcialmente, la hidrogenólisis del enlace C–Cl. De este modo, se completó la incorporación del brazo espaciador en la posición deseada del anillo aromático, obteniéndose el compuesto **11** tras dos etapas con un rendimiento global del 72% (Esquema 3.8).



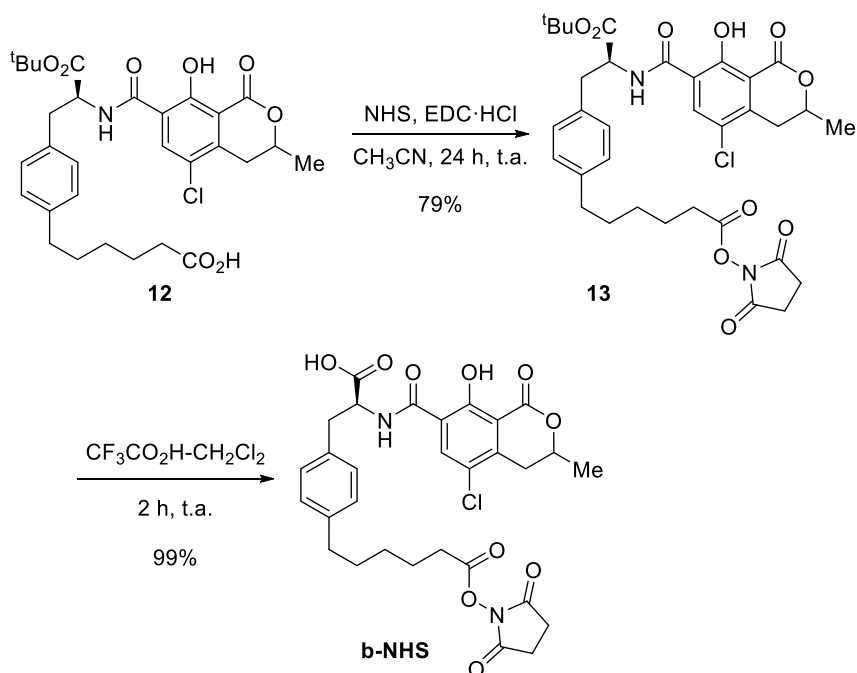
Esquema 3.8. Acoplamiento de Sonogashira entre el derivado yodado **8** y el alquino **9** e hidrogenación del producto **10** para obtener **11**.

Una vez completado el esqueleto hidrocarbonado del hapteno **b**, se llevó a cabo la hidrólisis quimioselectiva del éster metílico. El objetivo era poder activar el grupo carboxilato terminal del brazo espaciador, como éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, dejando la eliminación del grupo éster *tert*-butílico para la última etapa de la síntesis. Utilizando esta estrategia no se obtiene realmente al hapteno **b** inicialmente propuesto, sino que se accede directamente al éster activo del mismo, listo para su conjugación proteica, evitando de este modo la necesidad de realizar una activación selectiva en presencia de los dos grupos carboxílicos. Para llevar a cabo esta transformación se recurrió a una hidrólisis enzimática catalizada por una lipasa (lipasa de *Candida antarctica*, CALB)²¹⁶ (Esquema 3.9). Esta lipasa se comercializa inmovilizada sobre una resina acrílica que facilita el posterior aislamiento del producto mediante filtración y posterior eliminación del disolvente.



Esquema 3.9. Hidrólisis enzimática quimioselectiva del éster metílico **11** para la obtención del ácido **12**.

Una vez hidrolizado el grupo carboxilato del extremo de la cadena espaciadora, se procedió a su activación utilizando *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) como agente de condensación, proporcionando, tras el procesado acuoso de la reacción, el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **13** con buen rendimiento. Finalmente, la preparación del hapteno **b** en forma de éster activo (**b-NHS**) se completó mediante la eliminación del grupo éster *tert*-butílico de **13**. Para ello se emplearon condiciones ácidas anhidras, compatibles con el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo, que implican el tratamiento de **13** con ácido trifluoroacético en diclorometano a temperatura ambiente (Esquema 3.10). La reacción transcurre suavemente, proporcionando, tras la evaporación del disolvente, el compuesto **b-NHS**. Dada su elevada pureza según el espectro de RMN de ¹H, el hapteno activado se usó directamente para la preparación de los conjugados proteicos.



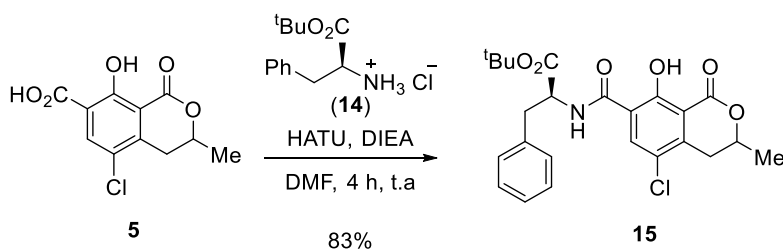
Esquema 3.10. Activación y desprotección del ácido **12** para la obtención del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno **b** (**b-NHS**).

Globalmente, la preparación de la forma activada de este hapteno se llevó a cabo a partir del producto comercial PCMC (**1**), siguiendo una síntesis lineal de diez etapas y con un rendimiento global del 19%.

3.1.1.3 Síntesis del hapteno **f**

El hapteno **f** no deja de ser la propia OTA, ya que la aproximación de conjugación empleada es a través de su propio grupo carboxilo. Como se ha comentado previamente, esta aproximación es la que se ha utilizado hasta la fecha para la generación de anticuerpos frente a OTA. Su activación suele llevarse a cabo *in situ* sin caracterizar el éster activo obtenido, realizando su conjugación a proteínas de forma poco controlada. En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis del hapteno **f** a partir de la condensación de la OT α racémica previamente preparada con Phe y la posterior activación del grupo carboxílico del mismo. El producto activado fue debidamente aislado, purificado y caracterizado antes de la conjugación, proceso que no había sido descrito con anterioridad.

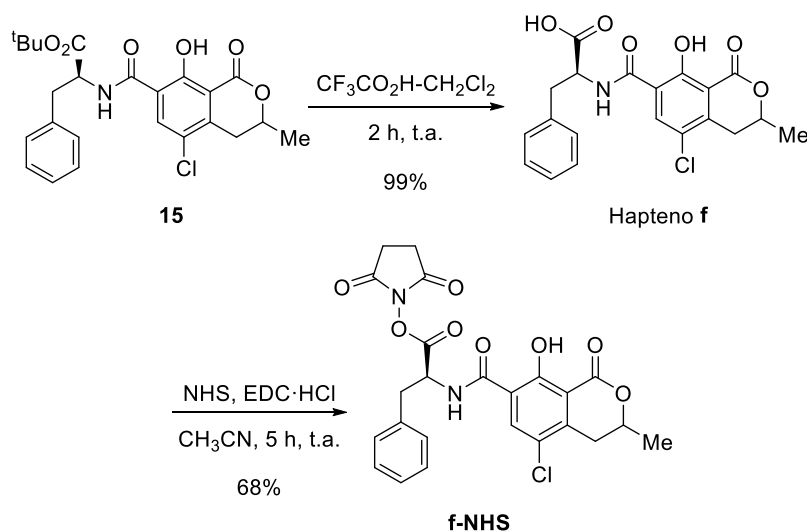
De forma análoga a la síntesis del intermedio yodado **8**, la preparación del esqueleto hidrocarbonado del hapteno **f** se llevó a cabo por condensación de la mezcla racémica de OT α (**5**) con el éster *terc*-butílico de Phe (**14**), empleando también HATU como agente de condensación, para obtener el compuesto **15** (Esquema 3.11).



Esquema 3.11. Acoplamiento entre **5** y el derivado de Phe **14** para obtener la amida **15**.

La eliminación del grupo *tert*-butilo se llevó a cabo en condiciones análogas a las empleadas previamente para el hapteno **b**: el tratamiento de **15** con ácido trifluoroacético en diclorometano dio lugar de forma prácticamente cuantitativa al hapteno **f**, una mezcla 1:1 de los diastereómeros (2*S*,3'*R*) y (2*S*,3'*S*) de OTA (Esquema 3.12), con un rendimiento global del 41% a partir de PCMC.

Por último, una vez obtenido el hapteno **f**, se procedió a su activación empleando la combinación de reactivos NHS/EDC en condiciones similares a las empleadas para el hapteno **b**. El procesado acuoso del crudo de reacción permitió la obtención del éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de OTA (**f-NHS**) con buen rendimiento. El aislamiento y caracterización del éster activo previa a la conjugación permite que esta sea llevada a cabo controlando de forma más precisa el número de haptenos introducidos en la estructura de la proteína.



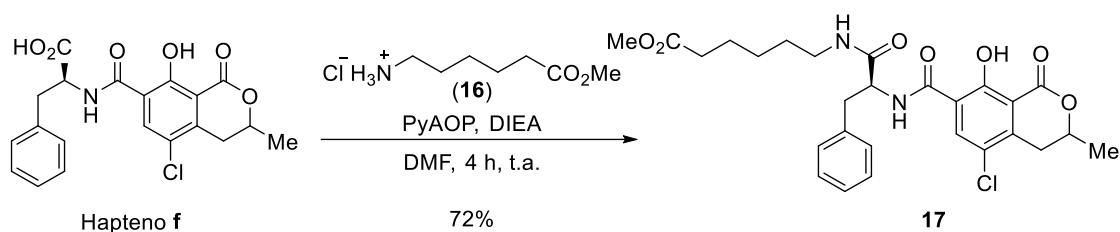
Esquema 3.12. Eliminación en condiciones ácidas del éster *tert*-butílico **15** y activación del ácido para la obtención de **f-NHS**.

A modo de resumen, la síntesis de la forma activada de este hapteno (**f-NHS**), considerando como material de partida el producto comercial PCMC (**1**), se completa a través de una síntesis de 7 etapas con un rendimiento global del 28%. No obstante, cabe destacar la facilidad con la que se podría obtener la forma activa de este hapteno empleando OTA comercial como producto de partida, así como la sencillez de su aislamiento y purificación mediante extracción del éster activo.

3.1.1.4 Síntesis del hapteno e

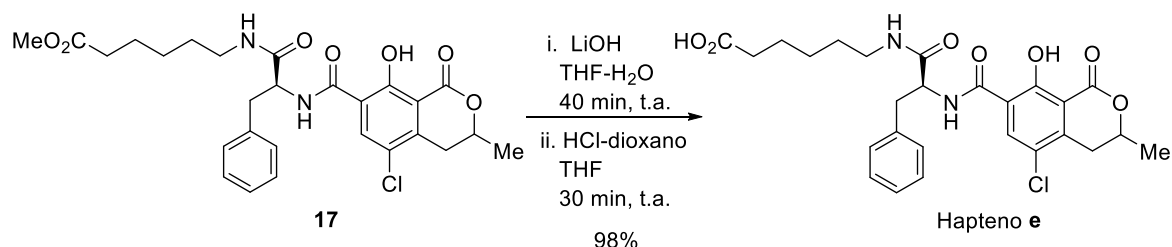
Al igual que el hapteno **f**, el hapteno **e** también utiliza el grupo carboxílico nativo de OTA como posición de conjugación, pero en este caso a través de un brazo hidrocarbonado de seis átomos de carbono que separa la estructura de OTA de la posición de conjugación a la proteína. La síntesis de este hapteno parte de la propia estructura de OTA (hapteno **f**), introduciéndose el brazo espaciador a través de un enlace amida formado por condensación del grupo carboxílico del hapteno **f** con el grupo amino del 6-aminohexanoato de metilo.

La diamida **17** se obtuvo con buen rendimiento mediante el acoplamiento de **f** con el amino éster **16** empleando PyAOP como agente de condensación²¹⁷ y *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) como base (Esquema 3.13).



Esquema 3.13. Introducción del brazo espaciador en el hapteno **e** a través de la formación del enlace amida entre el hapteno **f** y el aminoéster **16**.

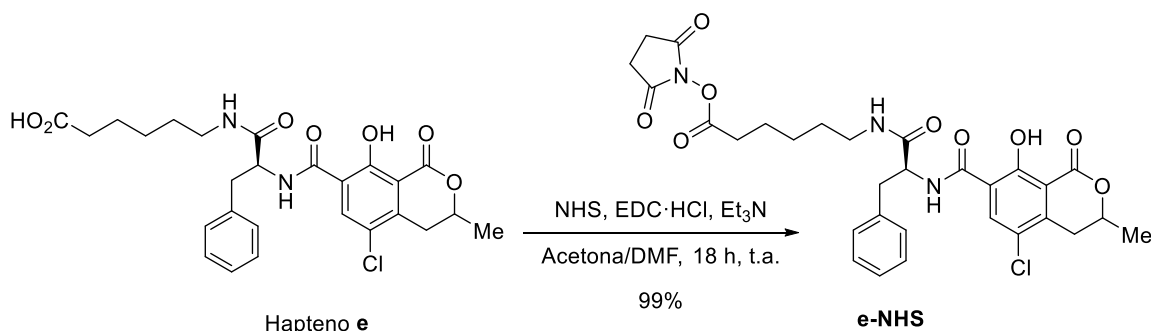
Una vez obtenido el esqueleto completo del hapteno **e**, se procedió a la hidrólisis del éster metílico en el extremo del brazo espaciador. Debido a la similitud del brazo espaciador de este hapteno con el del hapteno **b**, inicialmente las condiciones ensayadas fueron análogas a las ya descritas en el Esquema 3.9. Estas condiciones resultaron no ser las más idóneas para el sustrato **17**, ya que la reacción no llegó a completarse a pesar de emplear tiempos de reacción largos. Por ello se recurrió a la hidrólisis básica descrita en el Esquema 3.14. Se empleó LiOH en una mezcla de THF-agua para asegurar así la solubilidad del sustrato. De nuevo, estas condiciones básicas originaron la apertura parcial del anillo de lactona del fragmento de dihidroisocumarina, haciendo necesario un breve tratamiento ácido para regenerarlo y obtener así la estructura del hapteno **e**.



Esquema 3.14. Hidrólisis básica del éster metílico **17** para la obtención del hapteno **e**.

Por último, para llevar a cabo la conjugación a las proteínas de forma controlada, se procedió a la activación del grupo carboxilo terminal. Inicialmente se emplearon las mismas

condiciones utilizadas para los haptenos **b** y **f**, para así obtener el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno **e**. Desafortunadamente, la baja solubilidad de este sustrato en acetonitrilo hizo que en todos los intentos de activación se recuperase una gran cantidad del producto de partida, obteniéndose rendimientos realmente bajos. Esto hizo necesario un cambio en el disolvente de reacción y la adición de una base (Esquema 3.15) que aumentase la reactividad del grupo ácido, facilitando así el ataque nucleofílico de este hacia la carbodiimida EDC, obteniéndose bajo estas nuevas condiciones, con un rendimiento casi cuantitativo, el hapteno activado **e-NHS**.

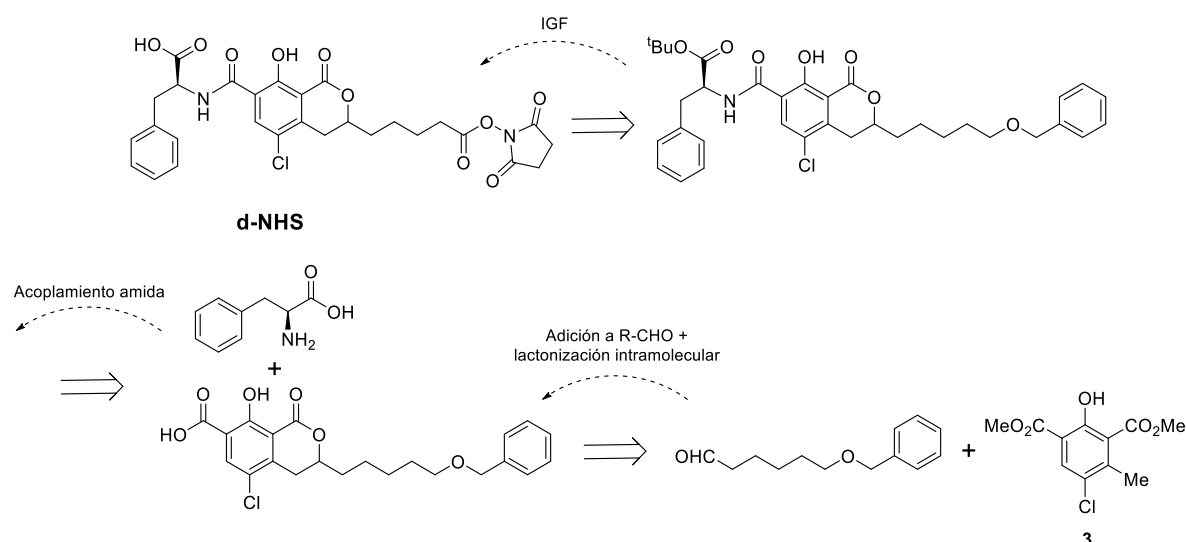


Esquema 3.15. Activación del hapteno **e** vía EDC/NHS.

En resumen, la síntesis de la forma activa del hapteno **e** (**e-NHS**) implica un total de 9 etapas a partir de PCMC (**1**) que transcurren con un rendimiento global de 28%. Al igual que ocurría con la forma activa del hapteno **f**, la preparación de este éster activo se podría haber llevado a cabo de manera sencilla a partir de OTA, proceso de tan solo tres etapas con un rendimiento global del 70%, y que, a pesar de su simplicidad, no ha sido descrito previamente en la bibliografía científica.

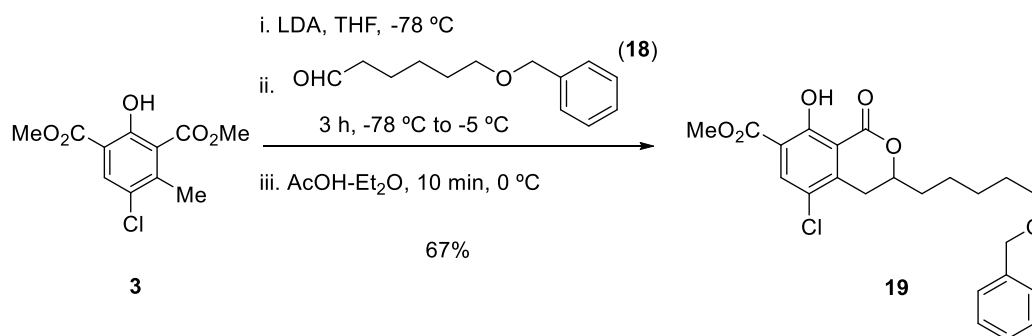
3.1.1.5 Síntesis del hapteno **d**

El hapteno **d**, al igual que el hapteno **b**, presenta el brazo espaciador en una posición alternativa al grupo carboxilo natural de OTA. Este hapteno fue diseñado para incluir el brazo espaciador en la posición más alejada posible de dicho grupo, para así asegurar una mejor exposición del mismo durante la respuesta inmune. Tal y como se indicó previamente, este hapteno presenta el brazo espaciador en el grupo metilo situado en el C-3' del anillo de dihidroisocumarina, y puede considerarse formalmente como una homologación del mismo. Para poder preparar el esqueleto carbonado de este hapteno (Esquema 3.16), se parte del intermedio **3** descrito en la síntesis de OT α , para así incorporar el brazo espaciador mediante una reacción análoga a la descrita en el Esquema 3.3. Una vez incorporado, se procede a la construcción del esqueleto de OTA mediante el acoplamiento con Phe. Finalmente, tras varias etapas de intercambio de grupo funcional (IGF), se obtuvo la forma activada del hapteno **d** (**d-NHS**).



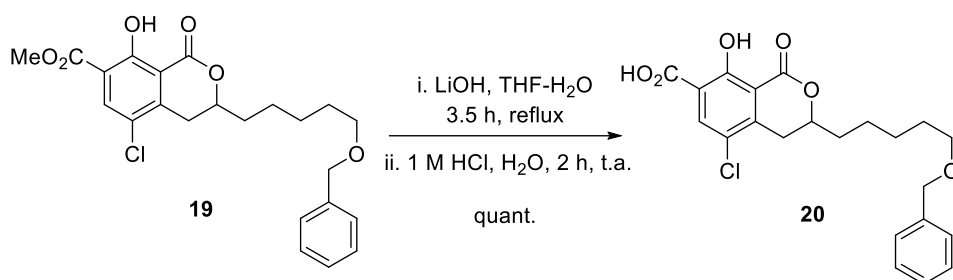
Esquema 3.16. Análisis retrosintético para la obtención del éster activo del hapteno **d** (**d-NHS**).

En la primera etapa de la síntesis de este hapteno, una alquilación bencílica similar a la llevada a cabo para preparar el intermedio $OT\alpha$, se empleó el aldehído convenientemente funcionalizado **18**.²¹⁸ Este aldehído incluye la cadena hidrocarbonada que realizará la función de brazo espaciador y un grupo hidroxilo terminal, protegido en forma de éter bencílico, que será posteriormente oxidado para dar lugar al grupo carboxilo a través del cual se llevará a cabo la conjugación del hapteno. El carbanión bencílico de **3** se generó empleando de nuevo LDA como base. Tras la adición al aldehído **18**, el alcóxido generado dio lugar a una lactonización intramolecular a través de un proceso de adición-eliminación obteniéndose el producto **19** (Esquema 3.17).



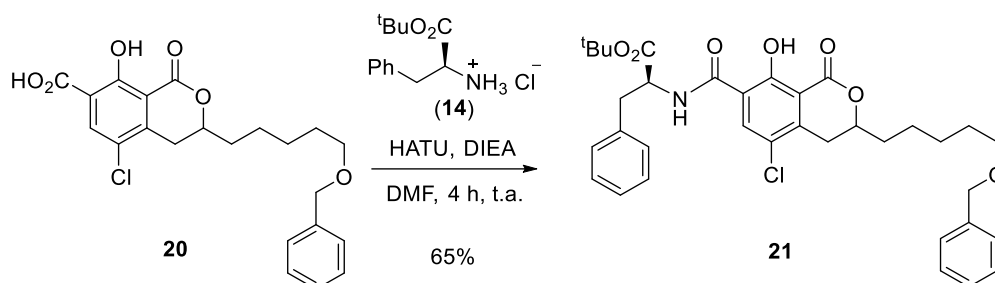
Esquema 3.17. Obtención del compuesto **19** a partir del diéster **3** y el aldehído **18**.

A continuación, se procedió a la hidrólisis del éster metílico en posición *orto* al grupo hidroxilo. Para ello se emplearon las mismas condiciones ya descritas para la obtención de $OT\alpha$: tratamiento del compuesto **19** con LiOH en THF acuoso a reflujo seguido de tratamiento ácido para regenerar el anillo lactónico (Esquema 3.18), con un rendimiento prácticamente cuantitativo. El compuesto **20** se obtuvo con la suficiente pureza como para no tener que ser purificado, pudiendo usarse como tal en la siguiente reacción.



Esquema 3.18. Hidrólisis del éster metílico de **19** para obtener el derivado de OT α **20**.

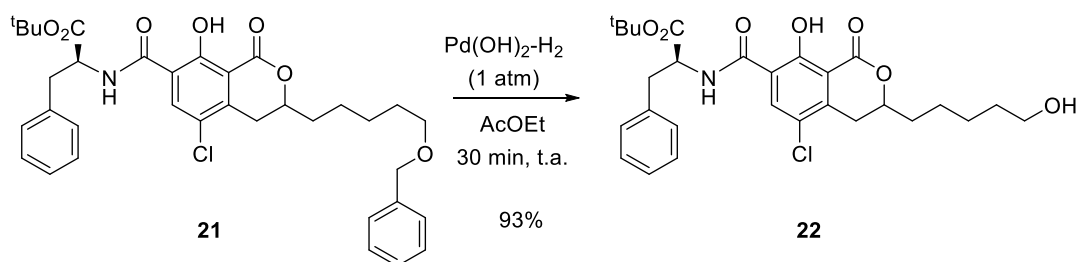
Al igual que en el caso de los haptenos previamente descritos, el esqueleto carbonado de **d** se completó mediante el acoplamiento del intermedio **20** con el derivado de Phe **14**, tal como se muestra en el Esquema 3.19. De nuevo se recurrió a HATU como agente de acoplamiento, obteniéndose el derivado **21** con un rendimiento moderado.



Esquema 3.19. Obtención de **21** a partir de la condensación entre **20** y **14**.

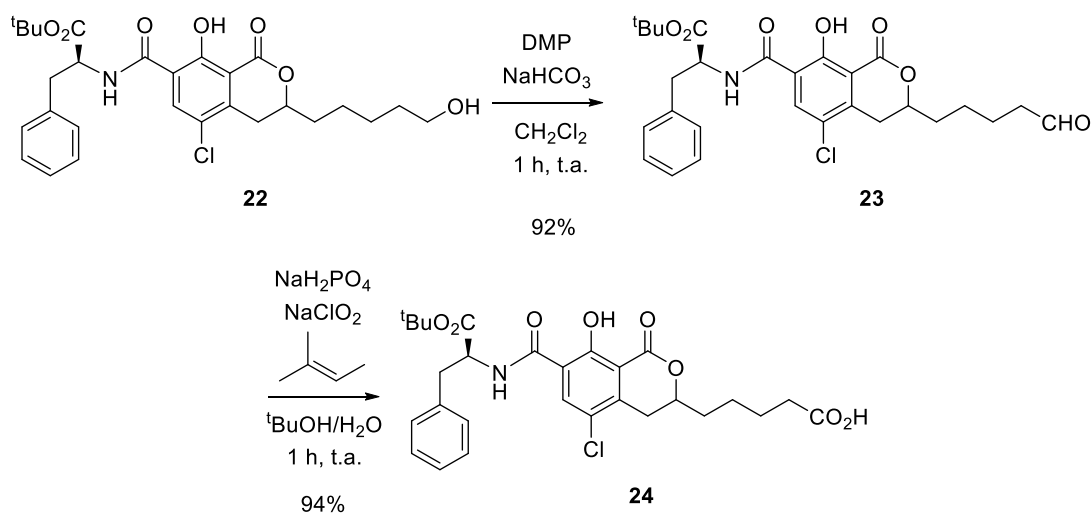
Una vez completado el esqueleto hidrocarbonado del hapteno **d**, solo se requirieron algunas etapas sencillas de modificación de los grupos funcionales presentes en el mismo para adaptarlos a los del hapteno objetivo. La primera de estas modificaciones fue la desprotección del grupo hidroxilo terminal del brazo espaciador. Para ello, se llevó a cabo la hidrogenólisis del éter bencílico empleando hidrógeno a presión atmosférica y Pd(OH)₂ como catalizador (Esquema 3.20). Estas condiciones de reacción pueden originar también la reducción del enlace C–Cl del anillo de dihidroisocumarina, y así se observó en tiempos largos de reacción, pero pudo minimizarse mediante la adecuada monitorización de la mezcla de reacción por cromatografía de capa fina.ⁱⁱ

ⁱⁱ Una alternativa a estas condiciones de desprotección fue el uso de BCl₃; desafortunadamente, el tratamiento de **21** con este reactivo en las condiciones habitualmente utilizadas para este tipo de reacción²⁵³ condujo a mezclas complejas de productos de difícil separación.



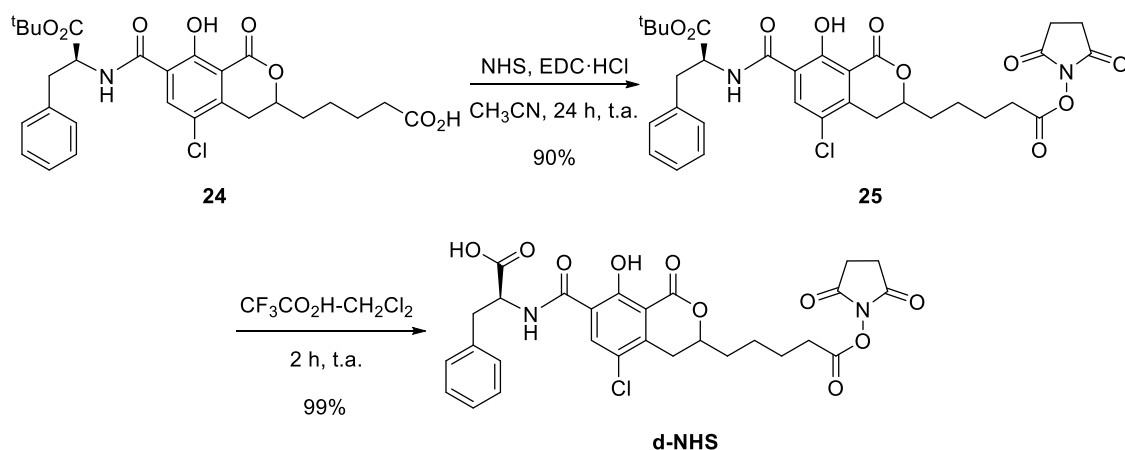
Esquema 3.20. Hidrogenólisis catalizada por Pd de la estructura **21** para la obtención del alcohol **22**.

La oxidación del grupo hidroxilo primario de **22** al correspondiente grupo carboxílico se llevó a cabo en dos etapas (Esquema 3.21). En primer lugar, oxidación con peryodinano de Dess-Martin para obtener el aldehído **23**, seguido de oxidación de este con clorito sódico (oxidación de Pinnick) en presencia de 2-metilbut-2-eno que actúa como captador del subproducto HOCl. El procedimiento de oxidación en dos etapas resultó muy eficaz, obteniéndose el ácido **24** a partir de **22** con un rendimiento global del 86%.



Esquema 3.21. Oxidación en dos etapas del alcohol terminal de la estructura **22** empleando DMP y NaClO_2 para obtener el ácido **24**.

Al igual que en el caso del hapteno **b**, la síntesis del hapteno **d** en la forma de éster activo, **d-NHS**, se completó en dos etapas. La primera de ellas comprende la transformación del grupo carboxílico del brazo espaciador de **24** en el correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimidilo **25**, por tratamiento con EDC y NHS. La segunda etapa consistió en la regeneración del grupo carboxílico nativo del fragmento de Phe de la estructura de OTA mediante eliminación quimioselectiva del éster *tert*-butílico por tratamiento con ácido trifluoroacético en CH_2Cl_2 (Esquema 3.22).

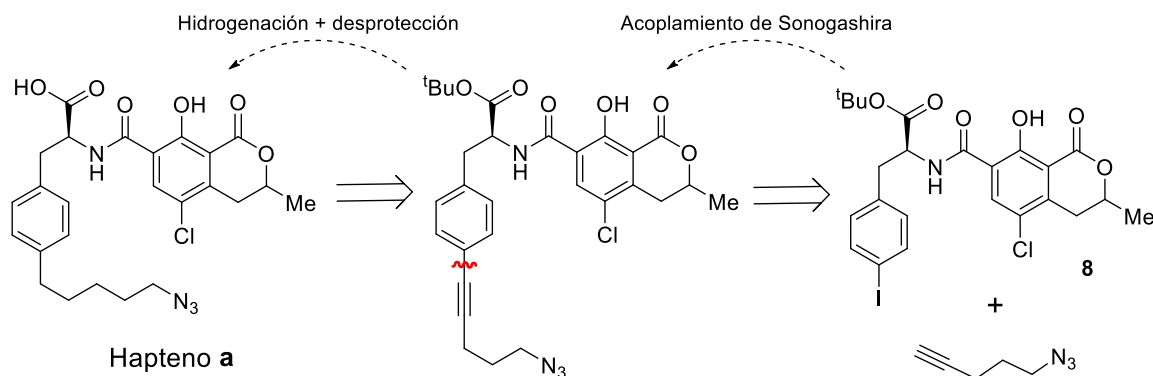


Esquema 3.22. Activación del ácido terminal de **24** y desprotección de **25** para obtener el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del hapteno **d** (**d-NHS**).

Tras esta última etapa, se obtuvo el hapteno **d** en forma de éster de *N*-hidroxisuccinimidilo (**d-NHS**) con una pureza eleva, contrastada por RMN de ^1H , sin necesidad de recurrir a la purificación cromatográfica del producto final ni de los productos obtenidos en las tres etapas previas. Esta ruta sintética consta de un total de 10 etapas que transcurren con un rendimiento global del 19% a partir del producto comercial PCMC (**1**).

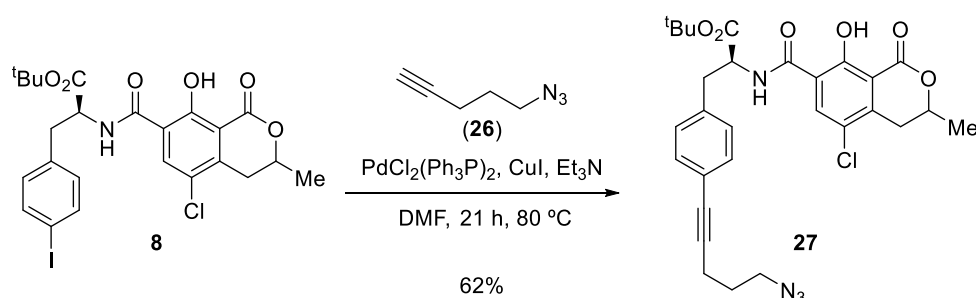
3.1.1.6 Síntesis del hapteno *a*

El hapteno **a** fue diseñado para ser conjugado a proteínas a través de una reacción de CuAAC. Para llevar a cabo este tipo de acoplamiento, se incluyó un grupo azida en el extremo de su brazo espaciador. La posición de conjugación del hapteno **a** es equivalente a la del hapteno **b** ya sintetizado, ya que ambos presentan el brazo espaciador hidrocarbonado en el C-4 del anillo de Phe. Debido a la similitud de ambos, el esquema retrosintético planteado fue muy similar (Esquema 3.23), aunque debido a que el grupo azida no requiere de protección, esta ruta implicó un número menor de etapas. Como producto de partida para la síntesis de este hapteno se utilizó el intermedio yodado **8**, preparado y caracterizado previamente durante la síntesis del hapteno **b**.



Esquema 3.23. Retrosíntesis planteada inicialmente para el hapteno **a**.

La ruta sintética de este hapteno comienza con una reacción de Sonogashira entre el intermedio yodado **8** y el alquino **26** para obtener el derivado alquinilado **27** (Esquema 3.24). En un principio se emplearon las mismas condiciones utilizadas para la preparación de su análogo carboxilado **10**. Sin embargo, el tratamiento del yoduro **8** con el 5-azidopent-1-ino (**26**), preparado a partir del correspondiente mesilato y azida sódica,²¹⁹ no condujo, en las condiciones utilizadas para la preparación del compuesto **10**, a la formación del producto de acoplamiento esperado, recuperándose en todos los ensayos que se llevaron a cabo el yoduro **8** inalterado. Un estudio más detallado de las condiciones de reacción reveló que la reacción de acoplamiento entre **8** y **26** sí que se producía de un modo relativamente eficaz cuando la reacción se llevaba a cabo a 80 °C durante un tiempo prolongado. Esta diferencia de reactividad entre los alquinos **9** y **26** en la reacción de acoplamiento con **8** resultó un tanto inesperada, y no se ha encontrado una razón convincente que permita explicarla de forma sencilla, aunque se podría aventurar la existencia en **26** de algún tipo de interacción entre el grupo azida y el triple enlace que limitase la reactividad de este para participar en las primeras etapas del ciclo catalítico implicado en la reacción de acoplamiento.

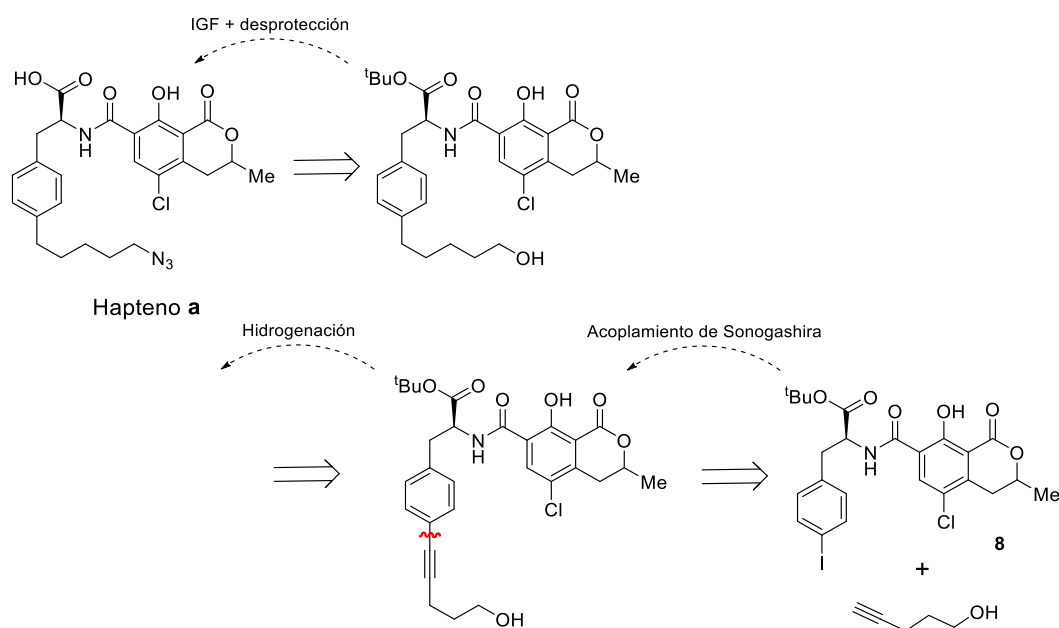


Esquema 3.24. Acoplamiento de Sonogashira entre el yoduro **8** y el alquino **26**.

Tal como estaba previsto en la secuencia sintética inicial, una vez se obtuvo el producto de Sonogashira, se procedió a la hidrogenación del triple enlace. La reducción se intentó llevar a cabo empleando diversos catalizadores, entre los que se encuentran 5% Rh/Al₂O₃, 10% Pd/C y el catalizador de Wilkinson. Con los dos primeros catalizadores heterogéneos se recuperó inalterado el alquino **27**, y en el caso del catalizador de Wilkinson se obtuvo mayoritariamente un producto cuya estructura no pudo ser determinada, pero que probablemente provenga de una reacción intramolecular entre el grupo azida y el triple enlace promovida por el catalizador. Los resultados obtenidos en los diferentes intentos de hidrogenación del alquino **27** también fueron un tanto inesperados, ya que existen ejemplos descritos para la hidrogenación de enlaces múltiples en presencia de grupos azida.^{220,221} Estos resultados contrastan de nuevo con el obtenido previamente en la hidrogenación del triple enlace análogo del precursor del hapteno **b** (compuesto **10**).

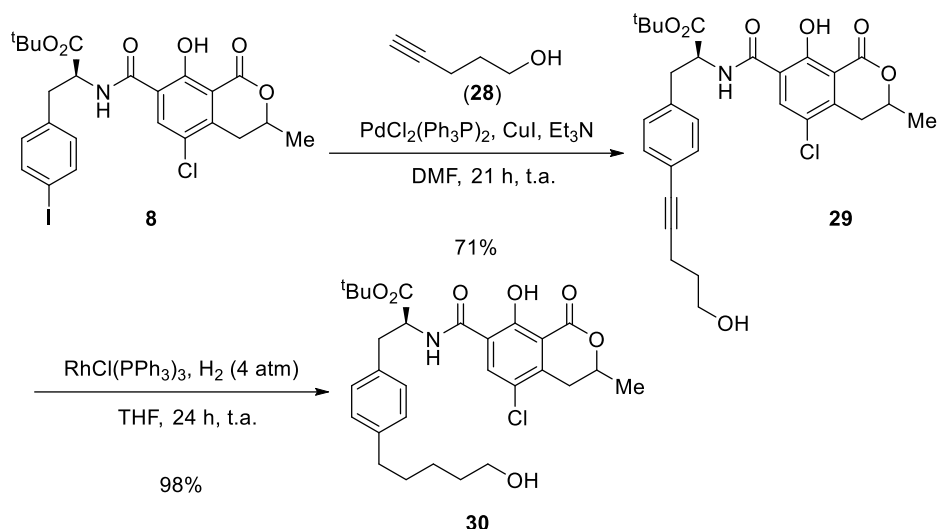
Hay que mencionar que, adicionalmente a las reacciones de acoplamiento e hidrogenación llevadas a cabo a partir del yoduro **8**, también se ensayaron las mismas sobre un modelo más simple como es el yoduro derivado de la Phe **7**. Con este sustrato, también fueron necesarias las mismas condiciones de temperatura y tiempo de reacción para que se produjese la reacción de acoplamiento con el alquino **26**, obteniéndose un rendimiento (38%) sensiblemente inferior al obtenido previamente. Cuando se intentó llevar a cabo la hidrogenación de este producto bajo las condiciones mencionadas para el alquino **27** tampoco hubo éxito, pues siempre se recuperaba el alquino inicial inalterado.

Ante la imposibilidad de seguir con el esquema sintético inicialmente previsto para el hapteno **a**, se planteó la alternativa que se muestra en el Esquema 3.25. En esta nueva ruta, la reacción de hidrogenación se realizaría previamente a la incorporación del grupo azida. Esto obligaría a la introducción de una etapa adicional de IGF que permitiese el intercambio del grupo hidroxilo terminal por el grupo azida necesario para la conjugación a través de CuAAC.



Esquema 3.25. Análisis retrosintético alternativo para la preparación del hapteno **a**.

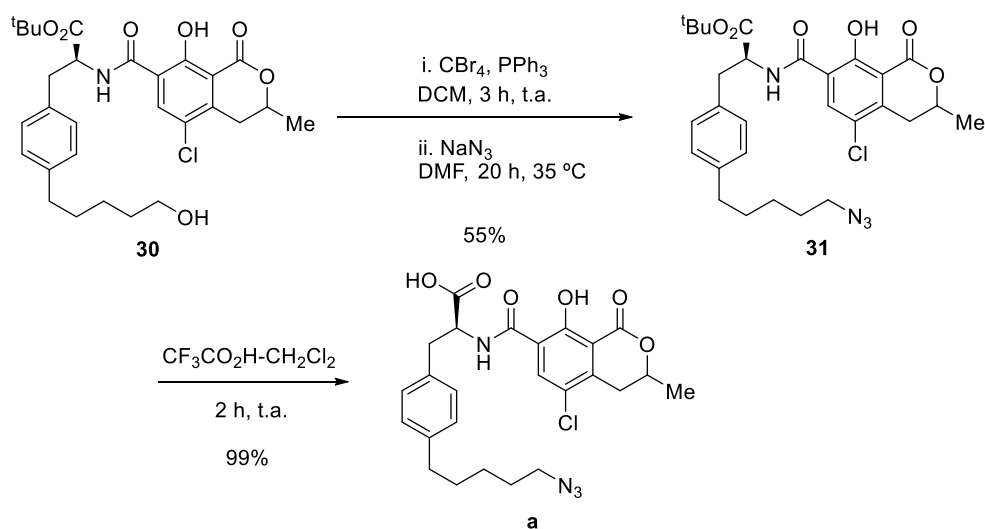
De nuevo, la primera etapa de esta ruta sintética implicó una reacción de Sonogashira entre el intermedio yodado **8** y el alquino comercial pent-4-in-1-ol (**28**). En esta ocasión, las condiciones empleadas inicialmente para la preparación del compuesto **10** en la ruta sintética del hapteno **b** permitieron la obtención del derivado alquinilado **29** bajo las condiciones habituales para este tipo de acoplamiento, *i.e.*, Pd(II) y Cu(I) a temperatura ambiente. Como era de esperar, la reducción por hidrogenación del triple enlace de **29** se llevó a cabo sin dificultad utilizando el catalizador de Wilkinson, obteniéndose el producto de hidrogenación **30** con excelente rendimiento (Esquema 3.26).



Esquema 3.26. Acoplamiento de Sonogashira entre **8** y el alquino **28** y posterior reducción del producto **29** para dar lugar a **30**.

Una vez obtenido el esqueleto hidrocarbonado completo del hapteno **a**, se pasó a la sustitución del grupo hidroxilo del brazo espaciador de **30** por el grupo azida necesario para la posterior conjugación del hapteno (Esquema 3.27). Esta transformación se llevó a cabo en dos etapas: primero se sustituyó el grupo hidroxilo por bromo, a través de la conocida reacción de Appel,^{222,223} para después sustituirlo por un grupo azida vía una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$. El rendimiento global de esta transformación fue moderado, debido principalmente a la primera etapa, ya que la sustitución del bromuro por el grupo azida se produjo de forma prácticamente cuantitativa.

Finalmente, la síntesis del hapteno **a** se completó mediante la eliminación del éster *tert*-butílico de **31**. Para ello se emplearon las mismas condiciones utilizadas en la última etapa de la síntesis del resto de haptenos y, al igual que en todos ellos, se consiguió un rendimiento casi cuantitativo.

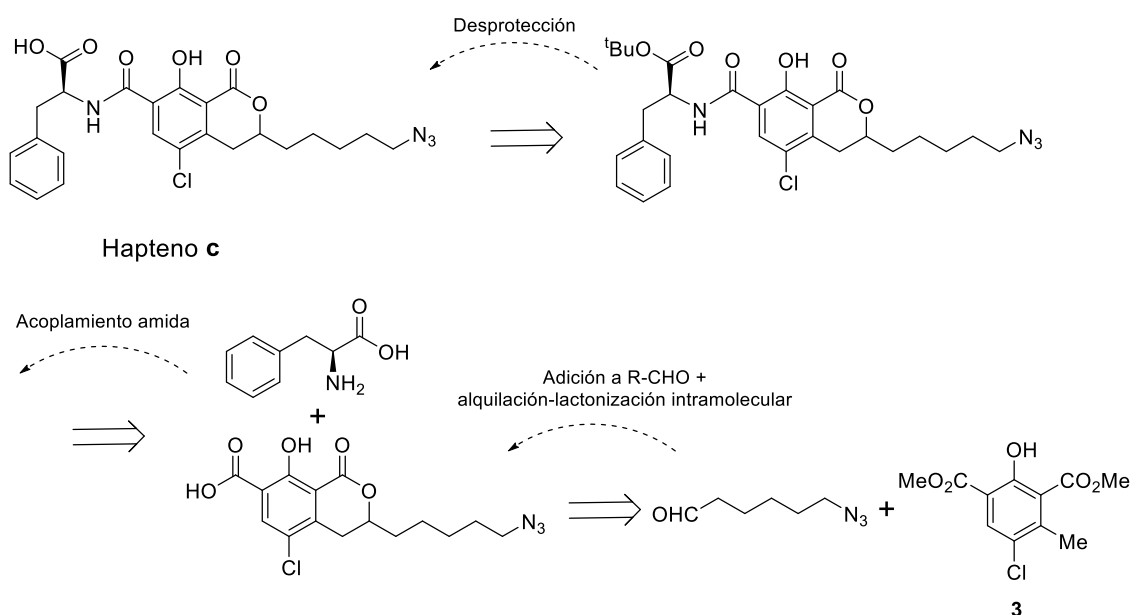


Esquema 3.27. Conversión del grupo hidroxilo de **30** en el grupo azida de **31** y eliminación ácida del éster *tert*-butílico de **31** para la obtención del hapteno **a**.

Las características espectroscópicas del hapteno **a** fueron coincidentes con las obtenidas para el hapteno **b**, a excepción de las diferencias atribuibles a los metilenos adyacentes al grupo azida. La preparación del hapteno **a** a través de la ruta modificada implica 9 etapas sintéticas desde PCMC (**1**), y transcurre con un rendimiento global del 15%.

3.1.1.7 Síntesis del hapteno **c**

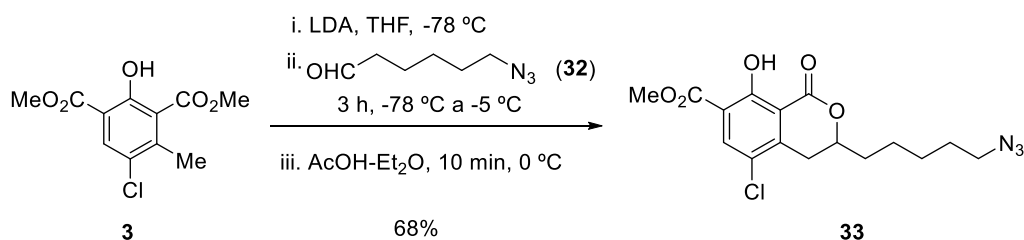
Este último hapteno también basa su conjugación en el grupo azida, presentando el brazo espaciador en el grupo metilo del C-3' del fragmento de dihidroisocumarina. Se trata por tanto de un análogo del hapteno **d**, ya que ambos presentan el mismo brazo espaciador, pero difieren en la naturaleza del grupo terminal. La aproximación sintética inicialmente propuesta para la preparación de este hapteno es muy similar a la del hapteno **d**, difiriendo solo en el aldehído empleado en la reacción de alquilación-lactonización intramolecular (Esquema 3.28). La utilización del grupo azida en lugar de un grupo carboxilo posibilita la síntesis de este hapteno en un número reducido de pasos, debido a que no es necesario recurrir a etapas de protección-desprotección ni intercambio de grupo funcional para completar la funcionalización de la posición de conjugación a la proteína.



Esquema 3.28. Retrosíntesis propuesta para el hapteno **c**.

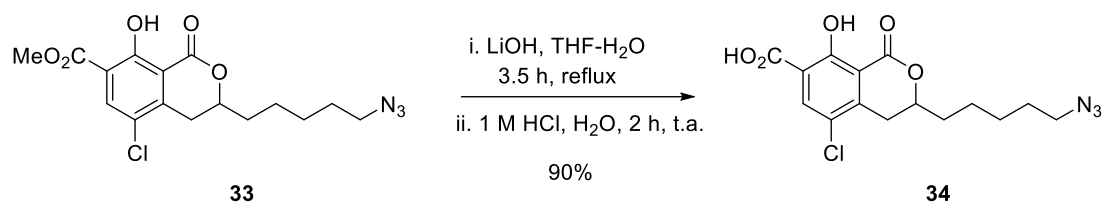
Tal y como se describió durante la preparación del hapteno **d**, el fragmento de dihidroisocumarina del hapteno **c** se preparó generando el carbanión bencílico de **3**, con LDA como base, que tras su adición nucleofílica al grupo carbonilo de 6-azidohexanal (**32**), preparado en dos etapas,^{224,225} genera un grupo alcóxido que reacciona intramolecularmente con el grupo

metoxicarbonilo próximo para dar lugar a una lactonización intramolecular que completa este fragmento (Esquema 3.29).



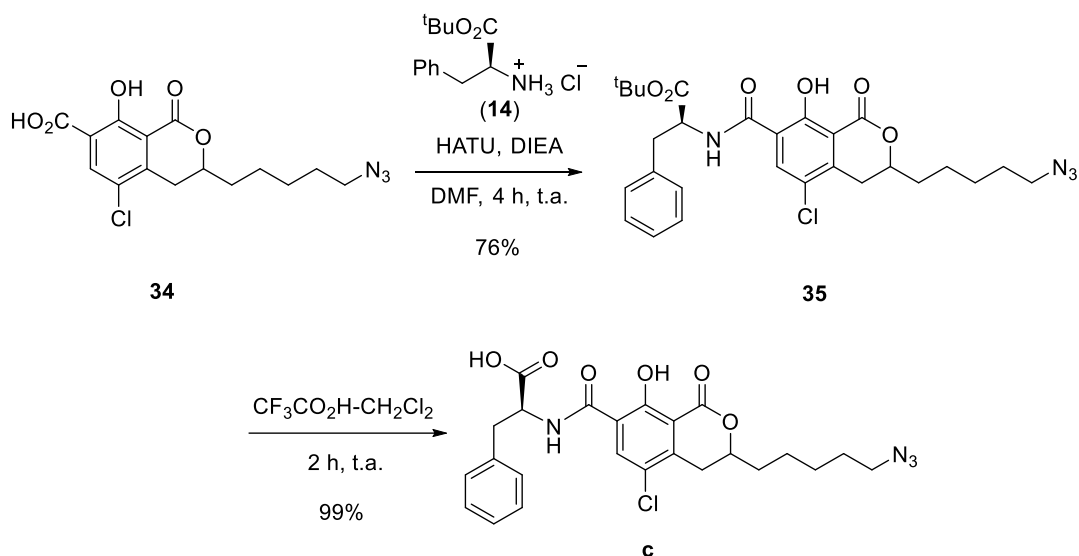
Esquema 3.29. Generación del anillo de dihidroisocumarina de **33** a partir de **3** y el aldehído **32**.

El siguiente paso en esta ruta sintética fue la hidrólisis en medio básico del éster metílico, para así generar el grupo carboxilo característico de OT α . Esta hidrólisis se llevó a cabo con LiOH, en una mezcla a partes iguales de THF y H₂O a reflujo (Esquema 3.30), condiciones aplicadas previamente en las etapa equivalentes de las síntesis del resto de haptenos. El intermedio **34** se obtuvo con un alto rendimiento y en un grado de pureza elevado sin necesidad de purificación cromatográfica.



Esquema 3.30. Hidrólisis del éster metílico en **33** para obtener el derivado de OT α **34**.

Como en la síntesis del resto de haptenos, para completar el esqueleto de OTA se empleó el éster *tert*-butílico del aminoácido Phe. La reacción de condensación con el ácido **34** se llevó a cabo utilizando el reactivo de acoplamiento HATU en condiciones análogas a las empleadas en la síntesis del resto de haptenos. Bajo estas condiciones se obtuvo la estructura **35** con un buen rendimiento tras la purificación cromatográfica. Finalmente, la síntesis del hapteno **c** se completó mediante la eliminación en medio ácido del éster *tert*-butílico de **35** empleando una mezcla de ácido trifluoroacético y diclorometano, para obtener así la estructura final del hapteno de forma casi cuantitativa (Esquema 3.31).



Esquema 3.31. Condensación mediada por HATU entre **34** y **14** para obtener la amida **35** y eliminación del grupo *tert*-butilo de este para obtener el hapteno **c**.

Las características espectroscópicas del hapteno **c** fueron coincidentes con las obtenidas para el hapteno **d**, a excepción de las diferencias atribuibles a la diferente funcionalización del brazo espaciador. Este hapteno se obtuvo tras una síntesis de 6 etapas con un rendimiento global del 28%.

3.1.2 Haptenos sintetizados: Esquema general

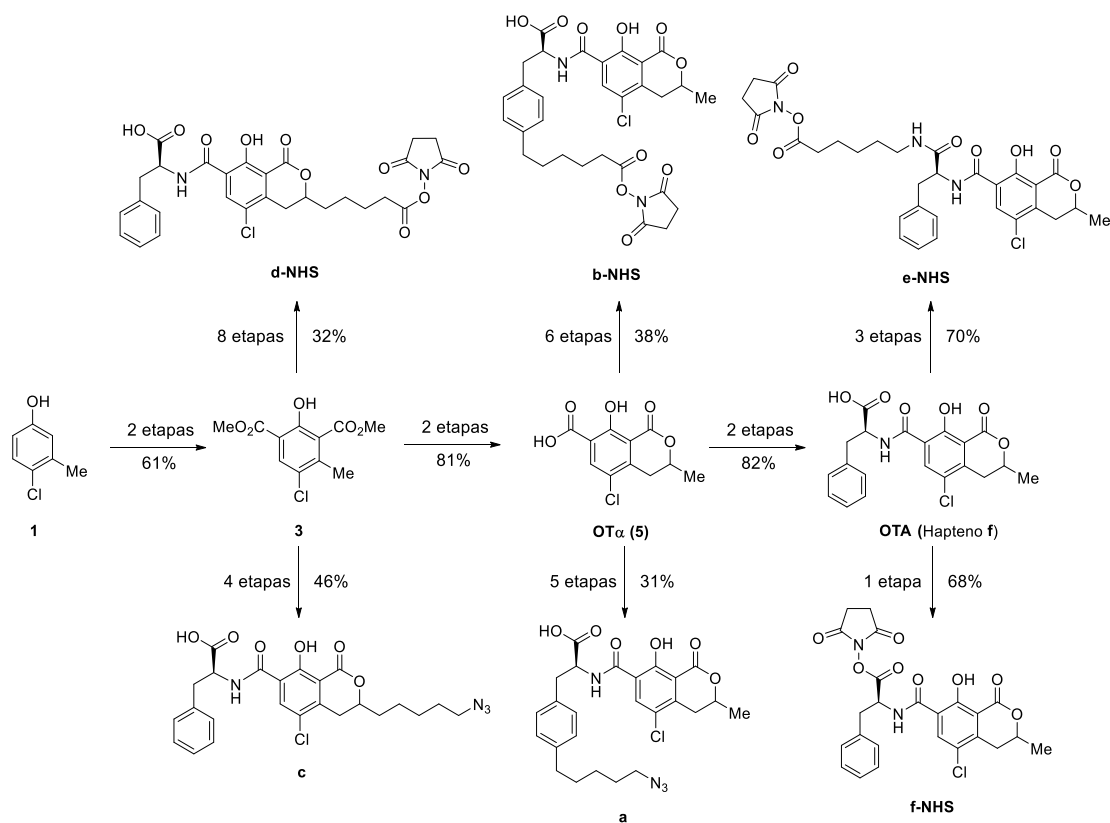


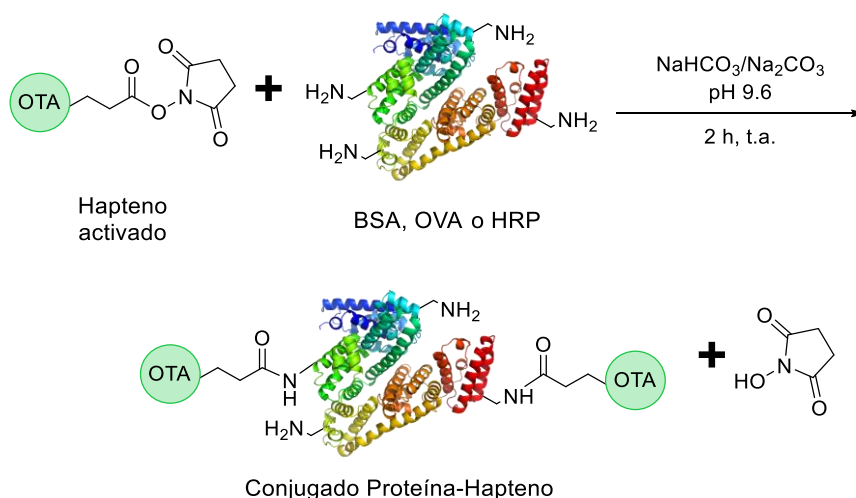
Figura 3.2. Resumen de la síntesis de los haptenos (o sus éteres activos) de OTA.

Se han sintetizado un total de 6 haptenos para la micotoxina ocratoxina A (Figura 3.2), todos ellos como mezcla 1:1 de diastereoisómeros (2*S*,3'*R*) y (2*S*,3'*S*). Cuatro de estos haptenos (**b**, **d**, **e**, y **f**) poseen un grupo ácido carboxílico en forma de éster activo en el brazo espaciador, grupo adecuado para su conjugación directa a través de la formación de un enlace amida con los restos de lisina de las proteínas portadoras. Por otra parte, la funcionalización del brazo espaciador de los haptenos **a** y **c**, un grupo azida, requiere la previa modificación de las proteínas para introducir en las mismas los restos alquínílicos necesarios para su conjugación vía CuAAC.

3.2 PREPARACIÓN DE CONJUGADOS PROTEÍNA–HAPTENO

3.2.1 Conjugación de haptenos basados en grupo carboxilo

Como ya se ha comentado, los haptenos con grupo funcional carboxílico se transformaron en sus correspondientes ésteres de NHS para la preparación de los diferentes conjugados proteicos, con o sin actividad enzimática (Esquema 3.32). Un conjugado empleado en la inmunización de animales de laboratorio debe presentar un número de haptenos relativamente elevado para asegurar una adecuada respuesta inmunológica, pero no tanto como para dar lugar a anticuerpos de baja afinidad o a disminuir la solubilidad de la proteína portadora. Por ello, la BSA fue la proteína escogida para la preparación de los conjugados de inmunización, una proteína globular de aproximadamente 66 kDa de cadena simple presente en el suero del ganado vacuno. La estructura primaria de esta proteína cuenta con un total de 59 residuos de lisina, de los cuales alrededor de 35 son accesibles en condiciones no desnaturalizantes para su uso en la conjugación de moléculas de bajo peso molecular.²²⁶



Esquema 3.32. Conjugación de los haptenos carboxilados de OTA a las diferentes proteínas de trabajo.

La reacción de los ésteres activos de los haptenos **b**, **d**, **e** y **f** con BSA se llevó a cabo en medio acuoso a pH 9.6, condiciones que permiten aumentar la cantidad de grupos amino en forma básica y elevar así su reactividad, y con ello la eficiencia de la conjugación. En todos los casos se empleó una relación molar hapteno/proteína inicial (RM_0) de 24:1, relación *a priori* suficiente para lograr una modificación de alrededor de 15 residuos de lisina, carga hapténica que permitiría la obtención de una respuesta inmune adecuada.^{109,227}

En cuanto a los conjugados de ensayo para el formato de ELISA indirecto (conjugados de tapizado), es deseable que presenten una carga hapténica reducida para facilitar el reconocimiento del analito, y por tanto una mayor afinidad aparente del anticuerpo y una superior sensibilidad del ensayo. Además, es importante que la proteína sea distinta a la utilizada en el conjugado de inmunización, ya que de lo contrario los anticuerpos policlonales podrían reconocer a la proteína en lugar del hapteno, o incluso no podría llevarse a cabo la selección efectiva de hibridomas durante la producción de anticuerpos monoclonales. La proteína elegida para la preparación de conjugados de tapizado fue la OVA, una albúmina de alrededor de 44.3 kDa de cadena simple presente en la clara del huevo de gallina. Además, en lo que respecta a la conjugación, su cadena polipeptídica contiene 20 residuos de lisina.²²⁸ La preparación de los conjugados de tapizado OVA–hapteno se llevó a cabo bajo las mismas condiciones empleadas para preparar los respectivos conjugados de BSA, utilizando una RM_0 de 8:1 con el fin de lograr una menor carga hapténica.

Por lo que respecta a los conjugados empleados en el ELISA en formato directo, también denominados trazadores enzimáticos, igualmente es conveniente que posean una carga hapténica baja. Además, es importante que la conjugación no altere significativamente su actividad enzimática. La enzima escogida fue la HRP, una glicoproteína de aproximadamente 44 kDa procedente de *Armoracia rusticana* que contiene 6 residuos de lisina, de los cuales 2 son accesibles en condiciones suaves.²²⁹ Esta enzima se caracteriza por una elevada actividad específica que permite catalizar la oxidación de ciertos sustratos en presencia de H_2O_2 para dar lugar a productos con propiedades fácilmente detectables. De nuevo se emplearon las mismas condiciones de conjugación utilizadas para el caso de BSA, pero al igual que se hizo durante la preparación de los conjugados de OVA, empleando una RM_0 de 8:1.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, todos los conjugados fueron purificados mediante cromatografía de exclusión molecular y se cuantificó su densidad hapténica mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Los valores de RM final se calcularon en base al peso molecular del hapteno y al aumento experimentado por el conjugado, utilizando como referencia la proteína sin modificar. Dicho incremento es claramente visible en los conjugados al superponer los diferentes espectros, como se muestra a modo de ejemplo en la Figura 3.3 para los conjugados

de BSA. Los espectros correspondientes a los conjugados de OVA y HRP se pueden consultar en el anexo B. Los resultados de RM obtenidos se recogen en la Tabla 3.1.

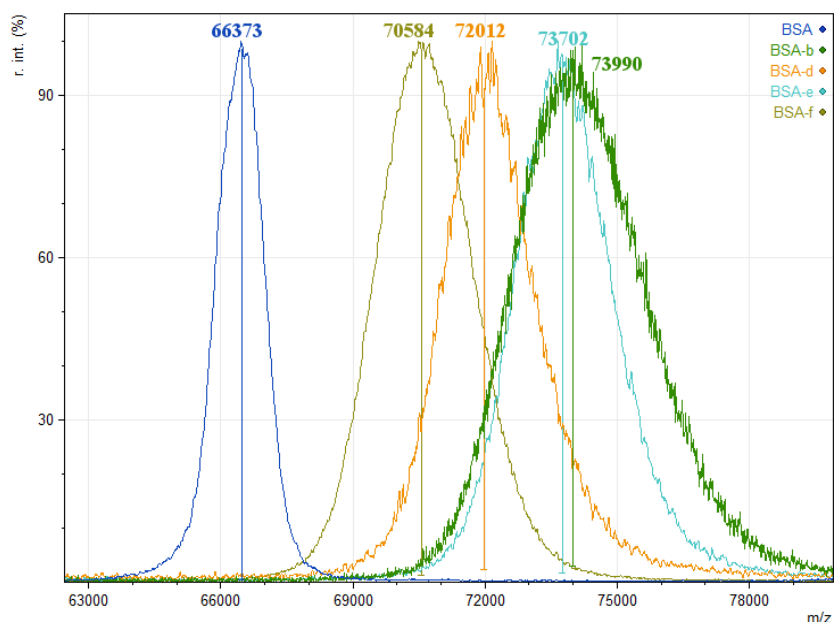


Figura 3.3. Espectros MALDI-TOF para los conjugados de BSA-OTA.

Tabla 3.1. Valores promedio de las relaciones molares hapteno/proteína de los conjugados preparados para los haptenos carboxilados de OTA.

Hapteno	Mw ^a	BSA		OVA ^d		HRP	
		Δ Mw ^b	RM ^c	Δ Mw	RM	Δ Mw	RM
b	501	7560	15.1	2517	10.0	525	1.1
d	472	5554	11.8	731	3.0	272	0.6
e	500	7214	14.4	739	3.1	454	0.9
f	385	4139	10.8	205	1.1	326	0.8

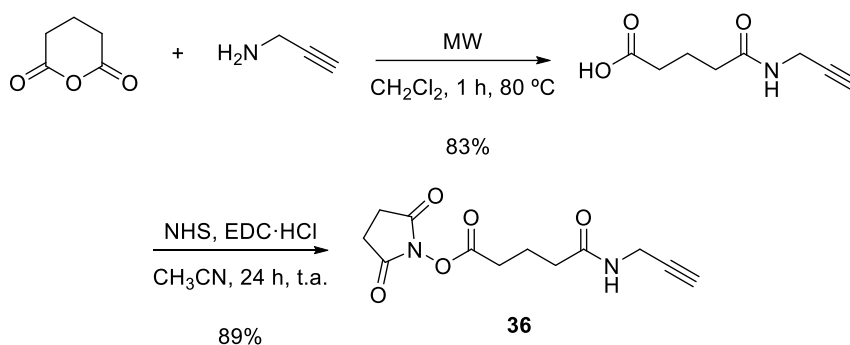
^a Peso molecular del hapteno (g/mol). ^b Incremento del peso molecular de la proteína. ^c Relación molar final. ^d Cálculos realizados con el pico $[M+2H]^{2+}$.

Todos los conjugados preparados presentaron densidades haptenicas coherentes con la proporción de hapteno/proteína utilizada, a excepción del conjugado de tapizado OVA-b. Este valor anormalmente alto de la RM puede deberse a una incorrecta estimación debida a una desorción o vuelo deficiente durante su análisis MALDI-TOF. Este hecho ha sido previamente observado en nuestro grupo para otros RM conjugados OVA-hapteno, observándose diferencias importantes en cuanto al proveedor y lote de la proteína. Por otra parte, la RM final de todos los conjugados de BSA se encuentra entre 10 y 15 residuos, valores adecuados para desencadenar la respuesta inmune. En el caso de los conjugados de tapizado OVA-hapteno, las RM finales obtenidas se encuentran por debajo de 4. Por último, para los conjugados enzimáticos de HRP-hapteno se obtuvo una RM final de alrededor de 1, marcaje en principio suficiente para la posterior obtención de señal.

3.2.2 Conjugación de haptenos basados en grupo azida

La conjugación de los haptenos **a** y **c** a las proteínas portadoras se llevó a cabo mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I) en la que participa el grupo azida terminal del hapteno y los grupos alquino introducidos previamente en la proteína. Como producto de esta reacción se obtiene un conjugado que incorpora la estructura del hapteno a la proteína portadora a través de un anillo de 1,2,3-triazol 1,4-disustituido.

Partiendo de la necesidad de una estructura de pequeño volumen con un alquino terminal, el compuesto seleccionado para llevar a cabo la funcionalización de las proteínas fue el éster activo del ácido 5-oxo-5-(prop-2-in-1-ilamino)pentanoico (**36**), el cual ya había sido empleado exitosamente para la producción de anticuerpos policlonales contra oligosacáridos por el grupo de Blixt y colaboradores.¹²⁴ Dicho alquino se preparó empleando anhídrido glutárico y propargilamina, obteniéndose el ácido deseado con un buen rendimiento y con un elevado grado de pureza.²³⁰ El grupo carboxilo terminal de este compuesto se activó bajo las mismas condiciones empleadas para los haptenos con un grupo carboxilo terminal (Esquema 3.33), *i.e.*, EDC/NHS en acetonitrilo, para obtener el alquino activado **36**.

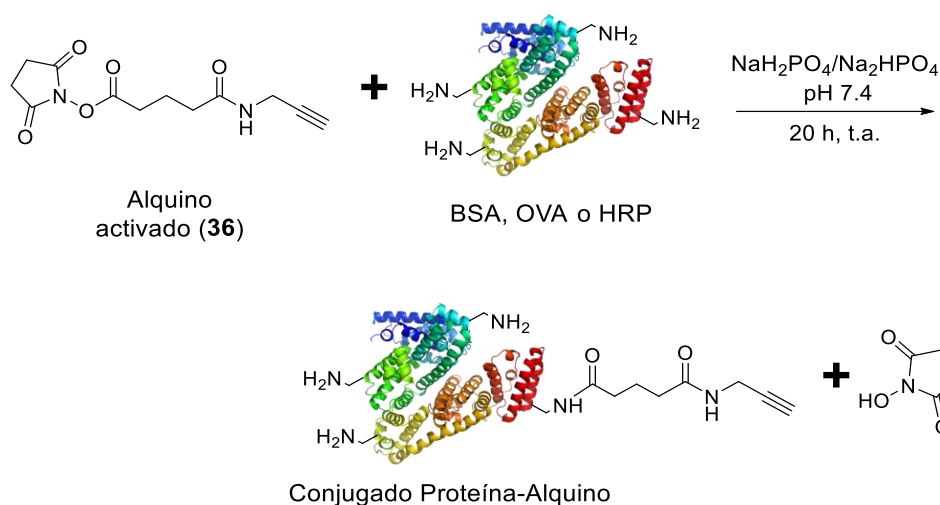


Esquema 3.33. Síntesis y activación del alquino **36** para la posterior modificación de proteínas.

Una vez obtenida la forma activada del alquino **36**, este se hizo reaccionar con BSA, OVA y HRP bajo condiciones similares a las empleadas para la conjugación del resto de haptenos. Las RM_0 empleadas variaron en función de la proteína, siendo de 25 para BSA, 12 para OVA y 10 para HRP (Esquema 3.34).

Los conjugados obtenidos fueron caracterizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. En el caso de BSA se obtuvo una media de 17.2 grupos alquinos por molécula de proteína, valor adecuado si se tiene en cuenta que en la etapa de CuAAC posterior se desean introducir alrededor de 15 moléculas de hapteno. En el caso de OVA se introdujeron 7.6 residuos, RM adecuada si se tiene en mente una RM del hapteno de OTA de 2-4. Por último, para HRP, solo se incorporaron 0.8 residuos de alquino a pesar de la alta RM_0 empleada, resultado coherente con

los obtenidos para los conjugados de HRP de los haptenos basados en grupo carboxilo en los que también se modificó únicamente un residuo.



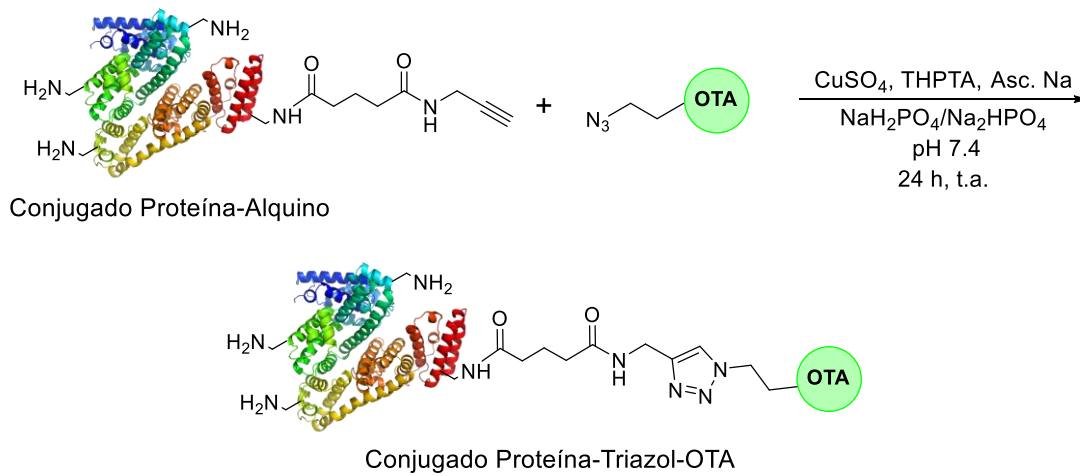
Esquema 3.34. Alquiniación de las proteínas de trabajo con el alquino **36** para la posterior reacción de CuAAC.

Las condiciones para llevar a cabo la reacción de CuAAC entre los haptenos **a** y **c** y las proteínas alquiladas estuvieron basadas en protocolos desarrollados por el grupo del profesor M. G. Finn.^{231,232} A grandes rasgos, estas condiciones emplean sales de Cu(II) que son reducidas *in situ* empleando ascorbato sódico. A su vez, se recomienda el uso de ligandos capaces de complejar al catión de Cu(I) para alargar su tiempo de vida, así como evitar la presencia de oxígeno en el medio de reacción. De todos los ligandos existentes para este fin,¹¹⁶ el más adecuado para reacciones llevadas a cabo en medio acuosos, debido a su mayor solubilidad, es el tris(3-hidroxipropil)triazolilmetil)amina (THPTA), disponible comercialmente (Esquema 3.35).

En dichos procedimientos, Finn y colaboradores describen las condiciones para llevar al cabo el acoplamiento en medio acuoso de moléculas orgánicas a macromoléculas que han sido marcadas únicamente con un resto de alquino. En nuestro caso, y particularmente con los conjugados de inmunización (BSA), era necesario modificar un número mucho más elevado de residuos de lisina para obtener un conjugado con buenas características inmunogénicas.

Con el objetivo de poner a punto las condiciones de la reacción de CuAAC se comenzó preparando los conjugados de BSA. Teniendo en cuenta el grado de marcaje con grupos alquino ($RM_{\text{alq}} = 17.2$) y la carga hapténica final necesaria en este tipo de conjugados, se emplearon 2 equivalentes de azida por residuo de alquino. No obstante, bajo estas condiciones se obtuvo una RM final de alrededor de 6, un grado de marcaje que consideramos insuficiente para un conjugado inmunogénico. Una evaluación de las condiciones de reacción mostró que empleando 6 equivalentes de azida se alcanzaba una RM final adecuada, *i.e.*, una carga hapténica de 15 residuos

para ambos haptenos. En el caso de los conjugados de OVA ($RM_{alq} = 7.6$), la necesidad de una carga hapténica más baja permitió volver a reducir el número de equivalentes a 2, consiguiéndose así una RM de 4.5 para el caso del hapteno **a** y 5.0 para el hapteno **c**. Por último, en el caso de HRP ($RM_{alq} = 0.8$), debido al bajo marcaje con grupos alquino, se emplearon directamente 4 equivalentes de azida con el objetivo de favorecer la reacción de cicloadición. Ambos trazadores enzimáticos mostraron una RM para los haptenos de OTA próxima a 0.7. A modo de ejemplo, en la Figura 3.4 se muestran los espectros obtenidos de los conjugados de BSA de los haptenos **a** y **c**. Los espectros MALDI de los conjugados de OVA y HRP se encuentran disponibles en el Anexo B.



Esquema 3.35. Reacción de CuAAC sobre las proteínas de trabajo modificadas y los haptenos de OTA.

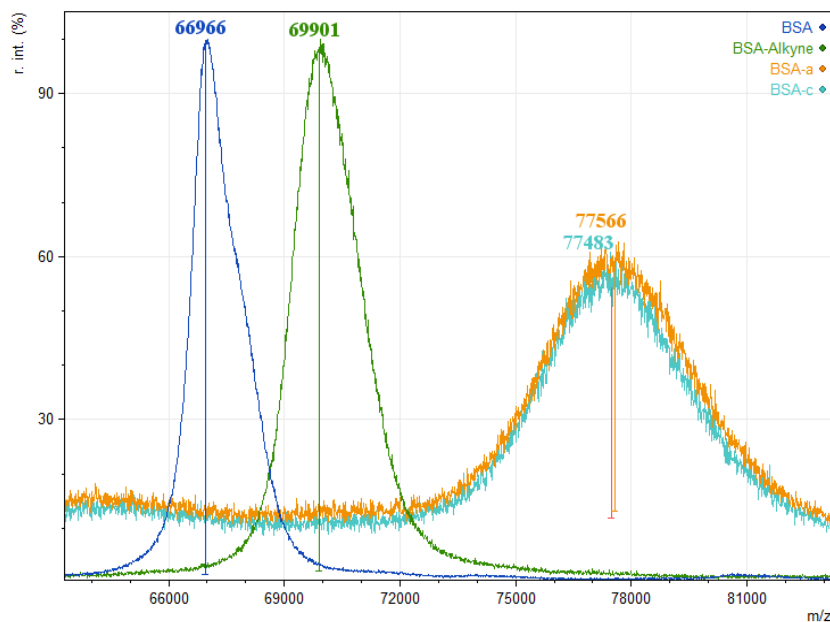


Figura 3.4. Espectros MALDI-TOF para los conjugados de BSA-OTA preparados mediante reacción de CuAAC.

Los resultados obtenidos para los tres tipos de conjugados muestran cómo es posible modular la carga hapténica final variando la cantidad de alquinos introducidos en la estructura de la proteína, así como los equivalentes de azida empleados.

3.3 GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Una vez obtenidos todos los conjugados de BSA que se emplearían como inmunógenos, se abordó la generación de anticuerpos policlonaes. Para ello, se inmunizaron 2 conejos con cada uno de los conjugados BSA–hapteno. La principal ventaja de los antisueros radica en la sencillez y rapidez de su obtención, además de que constituyen un reflejo directo de la respuesta cruda inmunitaria del animal ante un determinado inmunógeno, lo que posibilita estudiar la correlación entre la estructura del hapteno y su potencial para inducir anticuerpos frente al analito de interés. En el caso concreto de esta Tesis Doctoral, los objetivos principales de la producción de anticuerpos policlonaes fueron dos: el primero de ellos era evaluar si posiciones de conjugación que no implicasen al grupo carboxilato nativo de OTA (haptenos **b** y **d**) resultaban más adecuadas para inducir la generación de anticuerpos frente a esta micotoxina que las posiciones convencionales (haptenos **e** y **f**); el segundo objetivo fue evaluar la viabilidad de la producción de anticuerpos específicos contra estructuras de bajo peso molecular, empleando OTA como modelo, a partir de conjugados basados en un reacción de CuAAC en los que se encuentra presente un anillo de triazol potencialmente inmunogénico (haptenos **a** y **c**).

3.3.1 Generación de anticuerpos policlonaes

El proceso de inmunización se llevó a cabo empleando dosis de 300 µg de los conjugados BSA–hapteno cada 3 semanas, administrando un total de 4 inyecciones a cada animal. Diez días después de la tercera inmunización, se extrajeron muestras de sangre y se analizaron mediante ELISA para comprobar si la respuesta inmunitaria estaba evolucionando de forma adecuada. Finalmente, transcurridos diez días desde la última inmunización, los animales fueron exanguinados, obteniéndose alrededor de 100 mL de sangre de cada uno de ellos. Tras la obtención del suero por centrifugación y posterior purificación de las inmunoglobulinas por fraccionamiento salino, se obtuvieron los pAbs deseados. Cada antisuero fue nombrado con un código formado por el hapteno del conjugado empleado como inmunógeno seguido de una cifra asignada de forma arbitraria (#1 o #2).

3.3.2 Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales

Los antisueros generados fueron evaluados en términos de afinidad hacia OTA mediante ELISA competitivo en distintos formatos. Por una parte, se empleó el formato de anticuerpo inmobilizado asistido por anticuerpo de captura, en el que el conjugado competidor incorpora la enzima. Por otra parte, también se realizaron ensayos en formato de conjugado inmobilizado con detección indirecta, lo que hace necesaria la adición de un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente para la generación de la señal. El valor del parámetro “c” de la ecuación de ajuste de estos ensayos competitivos se tomó como una estimación de la afinidad de los anticuerpos hacia OTA. Como ya se ha mencionado, dicho parámetro se conoce habitualmente como IC_{50} , ya que coincide con la concentración de analito que reduce un 50% la A_{max} si la A_{min} se aproxima a cero. Para obtener una adecuada estimación de la afinidad del anticuerpo mediante ELISA competitivo es necesario que la concentración de anticuerpo y conjugado competidor sean limitantes. En consecuencia, se realizaron ELISAs competitivos bidimensionales (Figura 3.5) en los que se ensayaron simultáneamente varias concentraciones de ambos reactivos, obteniéndose una curva de inhibición para cada una de ellas.

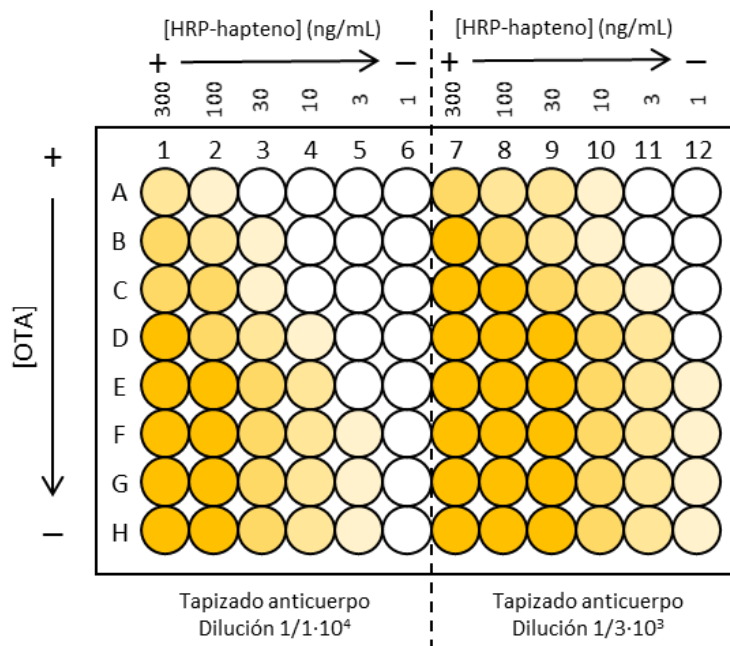


Figura 3.5. Ejemplo del diseño de una placa ELISA para la caracterización de los antisueros de conejo mediante ensayo competitivo directo bidimensional.

3.3.2.1 Evaluación de la posición de conjugación sobre la respuesta inmune

Tal y como se viene señalando en las secciones previas, el grupo carboxilo nativo de OTA puede representar un importante determinante antigénico durante la respuesta inmune a la hora de generar el paratopo de los anticuerpos. Nuestra hipótesis planteaba que la presencia de la

forma libre de este grupo en los conjugados de inmunización podría dar lugar a anticuerpos con mejores características en términos de afinidad hacia OTA que en los casos en los que dicho grupo es empleado para llevar a cabo la conjugación. La evaluación de estos antisueros permitiría establecer una relación entre la estructura del inmunógeno y la afinidad frente a OTA, además de poder extraer conclusiones sobre la importancia de dicho grupo carboxilo.

Formato ELISA directo

Este formato de ensayo se llevó a cabo empleando un anticuerpo de captura para evitar la inmovilización directa sobre la superficie del pocillo de los pAbs anti-OTA, ya que esto podría originar cambios conformacionales que modificasen su actividad. Como anticuerpo de tapizado se empleó anticuerpo policlonal de cabra (GAR, *goat anti-rabbit*), que se utilizó a una concentración constante. Una vez acondicionados los pocillos con este anticuerpo, se ensayaron varias diluciones de los antisueros de interés. En la etapa competitiva se empleó una curva de calibrado de OTA y varias concentraciones de los conjugados enzimáticos HRP–hapteno. Además, cada pAb se ensayó empleando tanto trazadores homólogos como heterólogos. Las IC₅₀ de las curvas de inhibición obtenidas se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Caracterización de los anticuerpos policlonales anti-OTA obtenidos a partir de haptenos carboxilados mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores homólogos y heterólogos.^a

pAb	Trazador enzimático											
	HRP–b			HRP–d			HRP–e			HRP–f		
	[pAb] ^b	[HRP] ^c	IC ₅₀ ^d	[pAb]	[HRP]	IC ₅₀	[pAb]	[HRP]	IC ₅₀	[pAb]	[HRP]	IC ₅₀
b#1	108	10	0.14	- ^e	-	-	4	100	0.10	-	-	-
b#2	36	30	1.88	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d#1	4	10	0.11	12	10	0.22	-	-	-	-	-	-
d#2	36	30	0.11	108	30	0.19	-	-	-	-	-	-
e#1	12	10	9.80	-	-	-	12	10	5.84	-	-	-
e#2	4	30	113.80	-	-	-	36	30	664.98	-	-	-
f#1	12	30	14.14	-	-	-	12	10	29.87	-	-	-
f#2	4	10	4.57	-	-	-	12	10	18.32	-	-	-

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.7 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Factor de dilución ×10⁻³. ^c Concentración expresada en ng/mL.

^d Valores expresados en nM. ^e No se obtuvo señal.

Todos los anticuerpos fueron capaces de reconocer a su trazador enzimático homólogo, a excepción de los pAbs **f#1** y **f#2**, que no generaron señal en presencia del trazador HRP–f, probablemente debido a la ausencia de brazo espaciador. Ninguna de las combinaciones heterólogas en las que interviniese dicho conjugado enzimático dio lugar a señal. No obstante, el

trazador enzimático HRP-**e**, que presenta la misma posición de conjugación, pero con brazo espaciador, sí que mostró actividad al ser ensayado con los pAbs **f#1** y **f#2**, por lo que estas condiciones se tomaron como homólogas para esta pareja de anticuerpos.

Cuando se evalúan las características de las combinaciones homólogas, se observa una mayor afinidad hacia OTA por parte de los antisueros obtenidos a partir de los haptenos con el grupo carboxilo libre (haptenos **b** y **d**), obteniéndose en casi todos los casos valores de IC_{50} inferiores a 1 nM. En este sentido, destacan los pAbs **d#1** y **d#2**, cuya elevada afinidad podría deberse a dos factores: por un lado, la menor modificación electrónica que se produce en la estructura del analito, al incorporar el brazo espaciador como una homologación del grupo metilo vía un enlace $C(sp^3)-C(sp^3)$; y por otro lado, que este hapteno es el que mejor expone el grupo carboxilo de OTA al incluir el brazo espaciador en una posición muy distal al mismo, *i.e.*, el C-3' del anillo de dihidroisocumarina, permitiendo generar paratopos en los que dicho grupo tenga una mayor contribución y, por lo tanto, más afines hacia la micotoxina de interés. Por el contrario, las afinidades mostradas por los anticuerpos generados a partir de los haptenos **e** y **f**, a pesar de ser elevadas (a excepción del pAb **e#2**), son considerablemente peores (IC_{50} superior). Estos resultados ponen de manifiesto la idoneidad de los haptenos **b** y **d** a la hora de producir anticuerpos con elevadas afinidades hacia OTA, y confirman nuestra hipótesis inicial sobre la importancia de no bloquear el grupo carboxilo nativo libre para obtener anticuerpos de elevada afinidad hacia esta micotoxina.

En el caso de los ensayos heterólogos, cabe destacar que los pAbs **d#1** y **d#2** únicamente son capaces de reconocer al trazador basado en el hapteno **b**, sin que se aprecien diferencias destacables en el valor de IC_{50} . Ambos haptenos presentan el grupo carboxilo libre, grupo que podría actuar como un determinante antigénico importante durante la generación de estos dos anticuerpos, hasta el punto que su ausencia en los haptenos **e** y **f** impide el reconocimiento de los mismos. No obstante, este argumento no es aplicable a los pAbs **b#1** y **b#2**, ya que no son capaces de reconocer al trazador basado en el hapteno **d**, a pesar de que en este derivado el grupo carboxilo se encuentra libre. Este resultado sugiere una mayor contribución por parte del fragmento de dihidroisocumarina, menos accesible en este hapteno, durante la interacción de estos dos anticuerpos. Por último, estos valores parecen indicar que el reconocimiento por parte de los pAbs derivados de los haptenos **e** y **f** se centra en la estructura de dihidroisocumarina, ya que todos ellos son capaces de reconocer al conjugado HRP-**b** donde esta se encuentra más expuesta, pero no reconocen al trazador HRP-**d**, en el que el brazo espaciador se ha situado en este fragmento.

Formato ELISA indirecto

En este formato se ensayaron también varias concentraciones del conjugado de tapizado OVA–hapteno, y a su vez varias diluciones del antisuero. Los parámetros de las mejores curvas de inhibición obtenidas para cada pareja de inmunorreactivos en este formato de ensayo se muestran en la Tabla 3.3.

Tal y como era de esperar, todos los pAbs generados fueron capaces de reconocer al conjugado OVA–hapteno homólogo. De nuevo, las afinidades de los antisueros obtenidos a partir de los haptenos **b** y **d** fueron superiores a las de los antisueros generados a partir de los haptenos **e** y **f**. Tal y como ocurría en el formato directo, los pAbs **d#1** y **d#2** presentaron las IC₅₀ más bajas de entre todas las combinaciones homólogas, seguidos por los pAbs **b#1** y **b#2**.

En cuanto a las combinaciones heterólogas, cabe destacar de nuevo las características de los pAbs **d#1** y **d#2**. Estos antisueros solo reconocen al conjugado OVA–**b**, el único que presenta el grupo carboxilo libre. Por otra parte, resulta llamativo que los pAbs **b#1** y **b#2** sean capaces de reconocer a todos los conjugados heterólogos. De nuevo, este hecho sugiere que en su interacción participa tanto el fragmento de dihidroisocumarina (más accesible en los haptenos **e** y **f**) como el de Phe (más accesible en el hapteno **d**). Por último, los anticuerpos generados a partir de los haptenos **e** y **f** no fueron capaces de reconocer al conjugado OVA–**d**.

Tabla 3.3. Caracterización de los anticuerpos policlonales anti-OTA obtenidos a partir de haptenos basados en grupo carboxilo mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.^a

pAb	Conjugado de tapizado											
	OVA–b			OVA–d			OVA–e			OVA–f		
	[pAb] ^b	[OVA] ^c	IC ₅₀ ^d	[pAb]	[OVA]	IC ₅₀	[pAb]	[OVA]	IC ₅₀	[pAb]	[OVA]	IC ₅₀
b#1	30	10	10.70	10	100	6.35	3	100	1.77	3	100	1.26
b#2	30	10	27.38	10	100	17.01	3	1000	366.55	3	1000	76.22
d#1	3	1000	177.42	10	10	7.10	- ^e	-	-	-	-	-
d#2	30	100	10.39	30	10	3.00	-	-	-	-	-	-
e#1	30	1000	40.84	-	-	-	30	100	56.75	30	100	23.93
e#2	30	100	n.i. ^f	-	-	-	10	100	5131.36	30	1000	n.i. ^f
f#1	30	100	1189.66	-	-	-	30	100	136.75	10	100	113.63
f#2	30	100	953.10	-	-	-	30	100	47.15	10	100	52.77

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} se encuentran entre 0.7 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Factor de dilución ×10⁻³. ^c Concentración de conjugado expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM. ^e No se obtuvo señal. ^f No se observó inhibición.

En resumen, estos resultados ponen de manifiesto la importancia antigénica del grupo carboxilo nativo de OTA, conclusión que viene avalada por la mayor afinidad de los anticuerpos generados a partir de conjugados donde dicho grupo se encuentra libre, *i.e.*, BSA-**b** y BSA-**d**.

Selectividad

La reactividad cruzada representa una medida del grado de reconocimiento por parte de un anticuerpo hacia un compuesto distinto al analito de interés, y por tanto de su selectividad. La forma más habitual de determinar el valor de este parámetro es ensayar como competidor el compuesto cuyo reconocimiento se pretende estudiar bajo las mismas condiciones empleadas para el analito diana. El cociente, expresado como porcentaje, entre el valor de IC₅₀ obtenido para el analito diana (OTA en este caso) y la IC₅₀ obtenida para el analito estudiado (OTB o OTC), nos dará el valor de RC, el cual será tanto más alto cuanto mayor sea el reconocimiento del compuesto estudiado, y viceversa. Se considera que un anticuerpo posee una elevada selectividad cuando el valor de RC hacia otros compuestos relevantes no supera el 1%.

Este concepto resulta de especial interés en esta Tesis Doctoral, ya que dos de las tres micotoxinas que componen la familia de las ocratoxinas presentan el grupo carboxilo nativo en forma libre (OTA y OTB) mientras que la tercera de ellas (OTC) presenta este grupo en forma de éster etílico. La evaluación de la reactividad cruzada se llevó a cabo mediante ELISA en formato directo con anticuerpo de captura y empleando trazadores homólogos.

Tal y como se observa en la Tabla 3.4, la posición de conjugación influye de manera significativa en la especificidad de los anticuerpos generados. Por una parte, ninguno de los pAbs reconoce claramente a OTB, indicando la importancia del átomo de cloro de OTA durante la interacción antígeno-anticuerpo. Por otra parte, mientras que los anticuerpos generados a partir de los haptenos **b** y **d** (con el grupo carboxilo libre) no reconocen a OTC, los producidos a partir de **e** y **f** (conjugados a partir del grupo carboxilo) no solo son capaces de reconocerlo, sino que lo hacen con afinidades muy superiores a las que presentan para OTA. Este resultado demuestra claramente que los haptenos **e** y **f** resultan más adecuados para la generación de anticuerpos contra OTC, lo que puede ser explicado por su mayor similitud estructural con esta micotoxina, ya que su grupo etilo forma parte del brazo espaciador (hapteno **e**) o se genera durante la conjugación a los restos de lisina de la proteína (hapteno **f**).

Tabla 3.4. Reactividad cruzada de los anticuerpos policlonales obtenidos para OTA a partir de haptenos carboxilados.^a

pAb	Reactividad cruzada (%)	
	OTB	OTC
b#1	2.4	0.1
b#2	3.1	0.2
d#1	1.4	0.1
d#2	2.4	0.1
e#1	0.7	465.0
e#2	5.7	2219.6
f#1	0.5	449.9
f#2	0.9	432.8

^a Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes. Las diferencias estructurales con OTA se muestran en rojo.

Por todo lo anterior, se puede concluir que los haptenos funcionalizados en posiciones diferentes al grupo carboxilo, como en el caso de los haptenos **b** y **d**, no solo originan anticuerpos de mayor afinidad hacia OTA que si se emplea el grupo carboxilato nativo para la conjugación (haptenos **e** y **f**), sino que también dan lugar a anticuerpos con mayor especificidad.

3.3.2.2 Evaluación de conjugados obtenidos por CuAAC en la respuesta inmune

Con el objetivo de evaluar la viabilidad de la obtención de anticuerpos de elevada afinidad empleando conjugados preparados a partir de una reacción de CuAAC, se generaron antisueros a partir de los haptenos basados en el grupo azida empleando como inmunógenos los conjugados BSA-a y BSA-c. El tamaño y la polaridad del anillo de triazol resultante de este tipo de acoplamiento lo convierten en una estructura con una capacidad antigénica potencialmente elevada susceptible de desviar la respuesta inmune hacia él. En el caso concreto de OTA, su mayor tamaño en relación a dicho anillo abriría la posibilidad de que la respuesta inmune generase anticuerpos capaces de reconocer a la micotoxina incluso a pesar de la presencia del grupo triazol en el brazo espaciador. Para validar esta hipótesis, los antisueros generados fueron evaluados mediante ELISA empleando como competidores los conjugados de OVA y HRP, también preparados por una reacción CuAAC. Paralelamente se emplearon como competidores los conjugados análogos de posición de los haptenos **b** y **d**, que pueden ser considerados como haptenos heterólogos de brazo espaciador al no presentar el anillo de triazol.

Formato ELISA directo

Al igual que se hizo con los haptenos con grupo funcional carboxílico, los antisueros se evaluaron inicialmente mediante el formato directo asistido por anticuerpo de captura. Mediante ensayos bidimensionales se determinaron las concentraciones de inmunorreactivos que daban lugar a las mejores curvas de inhibición en el formato homólogo y así determinar la afinidad de los antisueros generados. Estas condiciones optimizadas se emplearon también con los competidores enzimáticos de **b** y **d** con el objetivo de evaluar el grado de participación del anillo de triazol en la interacción anticuerpo–hapteno (Tabla 3.5).

Cuando se emplearon trazadores homólogos, los antisueros obtenidos a partir del hapteno **c** mostraron una sensibilidad considerablemente superior a los obtenidos a partir del hapteno **a**. Recordemos que ya se obtuvo un resultado similar cuando se evaluaron los antisueros a partir de los haptenos **b** y **d**, y que quizás este hecho esté relacionado con una mejor exposición del grupo carboxilo en los haptenos con el brazo espaciador en el anillo de dihidroisocumarina. Por otra parte, los antisueros generados a partir de ambos haptenos son capaces de reconocer a sus respectivos heterólogos de brazo espaciador, los trazadores HRP–**b** y HRP–**d**. Sin embargo, cuando se comparan los títulos y las afinidades de cada antisuero con su respectiva pareja de trazadores, HRP–**a**/HRP–**b** o HRP–**c**/HRP–**d**, en todos los casos se observa un menor reconocimiento y un aumento de la detectabilidad cuando se sustituye el trazador homólogo basado en CuAAC por su equivalente sin el anillo de triazol (efecto de heterología de brazo espaciador). Este resultado sugiere un cierto grado de participación del anillo de triazol en la formación del complejo anticuerpo–hapteno. Su ausencia en los conjugados HRP–**b** y HRP–**d** permite que dicho complejo sea más fácilmente desplazado por OTA, originando una disminución en el valor de IC₅₀.

Tabla 3.5. Caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos para OTA a partir de haptenos basados en grupo azida mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con conjugados homólogos y heterólogos.^a

	Trazador enzimático						Trazador enzimático						
	HRP–a			HRP–b			HRP–c			HRP–d			
pAb	[pAb] ^b	[HRP] ^c	A _{max}	IC ₅₀ ^d	A _{max}	IC ₅₀	pAb	[pAb]	[HRP]	A _{max}	IC ₅₀	A _{max}	IC ₅₀
a#1	12	10	1.92	32.2	1.71	5.2	c#1	12	10	0.99	2.1	0.30	0.5
a#2	12	10	1.87	44.0	1.28	4.1	c#2	12	10	1.66	1.1	0.89	0.2

^a Los valores de IC₅₀ y señal son la media de tres determinaciones independientes. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Factor de dilución ×10⁻³. ^c Concentración de conjugado expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM.

Formato ELISA indirecto

En este formato se procedió de forma similar al formato directo empleando los conjugados OVA–hapteno como competidores. En la Tabla 3.6 se muestran la señal máxima e IC₅₀ para cada pareja de inmunorreactivos en ensayos competitivos.

Los valores de IC₅₀ en este formato para los cuatro antisueros fueron similares, aunque ligeramente superiores en el caso de los obtenidos a partir del hapteno **c**. Cuando se emplearon los conjugados heterólogos de brazo espaciador, se produjo una mejora de sensibilidad para los pAbs **c#1** y **c#2**, sin ocasionar pérdida de reconocimiento hacia el conjugado, obteniéndose la misma señal con idénticas concentraciones de inmunorreactivos. Esta mejora no se observa en el caso de los antisueros obtenidos a partir del hapteno **a**, cosa que sí ocurría en el formato directo.

Tabla 3.6. Caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos para OTA a partir de haptenos basados en grupo azida mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.^a

pAb	[pAb] ^b	[OVA] ^c	Conjugado de tapizado				Conjugado de tapizado						
			OVA–a		OVA–b		OVA–c		OVA–d				
			A _{max}	IC ₅₀ ^d	A _{max}	IC ₅₀	A _{max}	IC ₅₀	A _{max}	IC ₅₀			
a#1	300	10	0.82	7.26	0.84	9.01	c#1	30	10	1.11	20.06	0.90	3.62
a#2	100	10	0.89	48.62	0.94	32.55	c#2	30	10	1.59	155.00	1.51	1.69

^a Los valores de IC₅₀ y señal son la media de tres determinaciones independientes. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Factor de dilución ×10⁻³. ^c Concentración de conjugado expresada en ng/mL. ^d Valores expresados en nM.

Como conclusión general podemos afirmar que la producción de anticuerpos de elevada afinidad hacia analitos de bajo peso molecular, como es el caso de OTA, es posible empleando conjugados preparados a través de reacciones de CuAAC. No obstante, OTA es un compuesto con una cierta complejidad estructural, lo que podría explicar la escasa influencia de la presencia del anillo de triazol en el brazo espaciador. Estudios posteriores con otros compuestos deberían contribuir a esclarecer la generalidad de esta aproximación para otros analitos.

3.4 GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

3.4.1 Producción de anticuerpos

La producción de anticuerpos monoclonales pasa por la obtención de hibridomas a partir de los linfocitos B del bazo de un animal inmunizado. Si bien en un primer momento se pensó en no abordar la tecnología de hibridomas con los conjugados que habían dado lugar a peores resultados en conejos (haptenos **e** y **f**), finalmente se decidió proceder a la inmunización de ratones con todos ellos.

Las pautas de inmunización de ratones fueron similares a las previamente descritas para conejos, aunque con dosis menores de conjugado: inoculaciones con 100 µg de los conjugados BSA–hapteno mediante inyección intraperitoneal cada 3 semanas hasta alcanzar un total de 3 inmunizaciones. Diez días después de la tercera inyección, se obtuvieron muestras de suero y se evaluó la respuesta inmune. Finalmente, 4 días antes del sacrificio, los animales fueron inoculados con una cuarta dosis de inmunógeno. Tras la extracción de los linfocitos B del bazo, estos se fusionaron con células de mieloma en una relación linfocito/mieloma 4:1. Varios días después, los sobrenadantes de cultivo fueron sometidos a un proceso de cribado mediante ELISA competitivo en formato indirecto con conjugado homólogo, empleando OTA natural para seleccionar aquellos que producían anticuerpos de elevada afinidad.

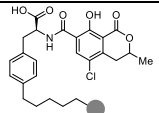
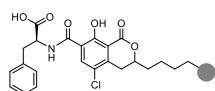
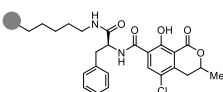
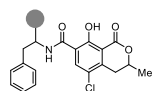
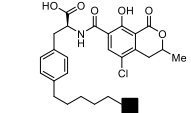
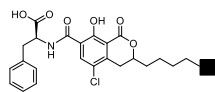
La selección de hibridomas se llevó a cabo en dos fases. En la primera, se determinó simultáneamente qué pocillos contenían anticuerpos capaces de reconocer al conjugado de tapizado y, de entre ellos, cuáles mostraban inhibición de señal debido al reconocimiento del analito en disolución.¹³² Los primeros pocillos reciben el nombre de positivos, mientras que a los segundos los denominamos competitivos. Tras este ELISA diferencial, una selección de los pocillos positivos y todos los pocillos competitivos se reevaluaron mediante ELISA competitivo bidimensional indirecto. Esta segunda evaluación permite obtener una información más detallada sobre la afinidad de los anticuerpos presentes en el medio de cultivo, y por tanto cuáles de ellos conviene seleccionar para su posterior clonación celular. Los resultados obtenidos en las fusiones realizadas se recogen en la Tabla 3.7.

A partir de todos los haptenos fue posible identificar hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer a OTA. No obstante, el número de pocillos tanto positivos como competitivos permiten extraer algunas conclusiones sobre la idoneidad de cada uno de ellos para generar mAbs frente a la micotoxina de interés. Por lo que respecta a los haptenos con grupo funcional carboxílico, si bien no existe una diferencia significativa en el porcentaje de pocillo positivos, sí se observa que los haptenos **b** y **d**, especialmente el segundo, dieron lugar a un número más elevado de hibridomas productores de anticuerpos de elevada afinidad (pocillos competitivos). Estos datos son coherentes con los resultados obtenidos en conejos, y demuestran que la respuesta inmune generada a partir de los haptenos **b** y **d** da lugar a un mayor número de linfocitos B productores de anticuerpos con elevada afinidad hacia OTA. En cuanto a los haptenos con grupo azida, el mejor de ellos fue el hapteno **c**, lo que de nuevo confirma la posición C-3' del anillo de dihidroisocumarina como la más adecuada para obtener anticuerpos frente a OTA. Además, merece la pena destacar que el número de anticuerpos con elevada capacidad para reconocer OTA no fue significativamente diferente entre los haptenos con grupo funcional

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

carboxilo y los haptenos con grupo funcional azida. Este dato parece indicar de nuevo que la participación del grupo triazol en la interacción anticuerpo–hapteno no es tan importante como se podría esperar, al menos en el caso de OTA.

Tabla 3.7. Resultados de las fusiones celulares realizadas a partir de ratones inmunizados con conjugados BSA–hapteno.

Inmunógeno	Nº Fusión	Nº Pocillos		Hibridomas estabilizados ^c
		Positivos ^a	Competitivos ^b	
	1	26 (1.5)	1	0
	2 ^d	42 (3.6)	4	3
	3 ^d	28 (2.7)	1	1
	1	32 (1.7)	8	5
	2	17 (0.9)	2	2
	1	18 (1.3)	2	2
	2	21 (1.2)	0	0
	1	4 (0.3)	0	0
	2	28 (1.9)	2	1
	1	183 (9.5)	4	3
	2	21 (1.4)	3	0
	1	57 (3.0)	8	4
	2	23 (1.7)	4	1

^a Número de pocillos que proporcionaron una señal superior a 1.0 en ausencia de analito. Entre paréntesis, el porcentaje con respecto al número de pocillos totales cultivados. ^b Número de pocillos en los que una concentración 100 nM de OTA causó una reducción de la señal superior al 80% con respecto al pocillo sin analito en el ELISA competitivo bidimensional. ^c Número de hibridomas productores de anticuerpos estabilizados. ^d La fusión se llevó a cabo empleando el bazo de un único ratón.

Tras la clonación de las líneas celulares de interés, se procedió a la producción de anticuerpos mediante su expansión *in vitro*. Los mAbs se purificaron mediante precipitación salina y cromatografía de afinidad, y se determinó su isotipo (Tabla 3.8). Los mAbs **b#310a** y **b#310b** representan subclones de un mismo pocillo inicial que fueron tratados como clones independientes, aunque era de esperar un comportamiento muy similar.

La productividad de la mayoría de los hibridomas estuvo comprendida entre 30 y 70 µg/mL de sobrenadante de cultivo, lo que permitió obtener fácilmente al menos 2 mg de cada mAb, cantidad suficiente para poder llevar a cabo su posterior caracterización mediante ELISA competitivo. En cuanto al isotipo, la cadena pesada de la mayoría de los anticuerpos fue γ_1 , mientras que casi todas las cadenas ligeras fueron κ .

Tabla 3.8. Anticuerpos monoclonales para OTA obtenidos a partir de los hibridomas aislados.

Inmunógeno	mAb	[mAb] ^a	Isotipo	Inmunógeno	mAb	[mAb]	Isotipo	
BSA-a	a#118	45.8	IgG ₁ (κ)	BSA-d	d#16	22.4	IgG ₁ (κ)	
	a#122	52.5	IgG ₁ (κ)		d#21	47.8	IgG _{2a} (κ)	
	a#125	61.9	IgG ₁ (κ)		d#27	63.1	IgG ₁ (κ)	
			d#111		38.3	IgG ₁ (κ)		
BSA-b	b#39	77.5	IgG ₁ (κ)	d#114	39.3	IgG ₁ (κ)		
	b#41	78.8	IgG _{2a} (κ)	d#115	24.2	IgG ₁ (κ)		
	b#310a	33.2	IgG ₁ (κ)	d#118	30.0	IgG ₁ (κ)		
	b#310b	41.2	IgG ₁ (κ)					
BSA-c	c#12	65.1	IgG ₁ (κ)	BSA-e	e#13	25.3	IgG ₁ (λ)	
	c#29	77.0	IgG ₁ (κ)	e#115	31.5	IgG ₁ (κ)		
	c#116	54.3	IgG ₁ (λ)	BSA-f	f#223	47.0	IgG ₁ (κ)	
	c#117	43.8	IgG ₁ (κ)					
	c#134	62.2	IgG _{2b} (κ)					

^a Concentración de anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivo (μg/mL).

3.4.2 Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales

Al igual que se hizo con los pAbs, se emplearon ambos formatos de ELISA competitivo para evaluar la afinidad de los mAbs obtenidos. En el caso del formato directo, se hizo uso de sus dos variantes, con anticuerpo de captura y sin él. De nuevo, el valor de IC₅₀ se tomó como una estimación de la afinidad del anticuerpo hacia OTA.

3.4.2.1 Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

Inicialmente, y con el objetivo de evitar posibles cambios conformacionales al inmovilizar los mAbs directamente sobre la placa de poliestireno, se empleó el formato directo asistido por anticuerpo de captura. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la Tabla 3.9.

Todos los mAbs fueron capaces de reconocer a su trazador enzimático homólogo. La única excepción fue el mAb f#223, muy probablemente debido a la ausencia de brazo espaciador en el trazador HRP-f. Al igual que ocurría con los antiseros de conejo, no se obtuvo señal en ninguna de las combinaciones heterólogas en las que interviniese dicho conjugado enzimático. A pesar de que algunos autores han descrito trazadores enzimáticos funcionales basados en el acoplamiento directo de OTA a HRP,^{90,175,184} en nuestra experiencia es habitual que enzimas marcadas con haptenos sin brazo espaciador, o con brazos espaciadores cortos, generen conjugados con baja actividad en ELISA.²³³⁻²³⁵ Esta falta de señal podría justificarse como consecuencia de impedimentos estéricos que dificultan la unión del anticuerpo al hapteno debido a la proximidad de este a la proteína, o bien como resultado de la inactivación de la enzima cuando el anticuerpo se une al hapteno acoplado a ella. Ensayos no competitivos llevados a cabo en disolución con este

trazador y los anticuerpos **f#223** y **e#115** mostraron que el conjugado mantenía su actividad independientemente de la concentración de anticuerpo, por lo que la inaccesibilidad del hapteno parece la hipótesis más probable.

Por otra parte, cabe destacar que la afinidad de todos los mAbs fue excelente, con valores de IC_{50} para muchos de ellos inferiores a 1 nM. De los resultados obtenidos se desprende también que el hapteno **d** fue el que proporcionó los anticuerpos con una afinidad más elevada hacia OTA, así como que los valores de IC_{50} obtenidos fueron los más homogéneos. Como ya habíamos postulado, la posición de anclaje de este hapteno parece permitir una mejor exposición del esqueleto completo de OTA, aumentando así la probabilidad de generar anticuerpos de elevada afinidad contra esta micotoxina. Por otra parte, el hapteno **c**, que presenta el brazo espaciador en la misma posición que el hapteno **d**, también dio lugar a anticuerpos con IC_{50} inferiores a 1 nM en 4 de los 5 casos estudiados. Este resultado pone de manifiesto que es posible obtener anticuerpos monoclonales de elevada afinidad hacia analitos de bajo peso molecular empleando conjugados preparados a través de una reacción de CuAAC, abriendo la puerta a aplicar esta aproximación innovadora a otros compuestos. En el caso del hapteno **b**, a pesar de haberse aislado únicamente 4 hibridomas, las afinidades hacia OTA de todo los mAbs fueron también excelentes, destacando especialmente los dos subclones del hibridoma **b#310**. Sin embargo, el hapteno **a**, si bien se trata de un análogo estructural del hapteno **b**, dio lugar a anticuerpos de menor afinidad. Por último, los pocos anticuerpos obtenidos a partir de los haptenos **e** y **f**, pese a no presentar en su estructura el grupo carboxilo libre, también mostraron elevadas afinidades en este formato de ensayo, en especial el mAb **f#223**.

En cuanto al comportamiento de los anticuerpos con haptenos heterólogos de brazo espaciador, cabe destacar que los trazadores HRP-**c** y HRP-**d**, en los que el sitio de anclaje se encuentra en la misma posición del anillo de dihidroisocumarina, fueron perfectamente reconocidos por todos los monoclonales derivados de los haptenos **c** y **d**. Asimismo, los trazadores HRP-**a** y HRP-**b**, equivalentes en cuanto a la posición del brazo espaciador en el anillo de Phe, se comportaron de manera muy parecida cuando se ensayaron frente a los anticuerpos derivados de los haptenos **a** y **b**. Este conjunto de resultados, unidos al hecho de que no se observaron diferencias remarcables en los valores de IC_{50} , evidencian que el grupo triazol juega un escaso papel en el reconocimiento por parte de todos estos anticuerpos. Por lo que respecta a la heterología de posición, se observó que los anticuerpos obtenidos a partir de los haptenos **c** y **d** mostraron un comportamiento muy restrictivo, ya que no reconocieron a ningún otro trazador heterólogo. Por el contrario, los monoclonales obtenidos a partir de los haptenos **a** y **b** mostraron un amplio abanico de reconocimiento, aunque sin mejoras apreciables en los valores de IC_{50} en la mayor parte

de los casos. Finalmente, los anticuerpos derivados de los haptenos **e** y **f** mostraron un comportamiento intermedio. En resumen, la afinidad de todos los mAbs fue excelente, con valores de IC_{50} para muchos de ellos inferiores a 1 nM en el formato homólogo, no habiéndose encontrado mejoras muy importantes mediante la utilización de trazadores heterólogos.

Por otra parte, dado que el formato directo sin anticuerpo de captura es una alternativa más sencilla y rápida al incluir una etapa menos, se decidió evaluar en este formato todos los mAbs. Como se puede ver en la Tabla 3.10, la gran mayoría de los monoclonales funcionaron perfectamente en este formato, siendo muy pocas las combinaciones que no dieron lugar a señal. En cuanto a los valores de IC_{50} , la casuística fue muy amplia, si bien en la mayoría de los casos las variaciones con respecto al formato directo asistido por anticuerpo de captura fueron muy pequeñas, y por tanto las conclusiones son esencialmente las mismas.

En definitiva, una vez evaluados todos los mAbs en ambas variantes del ELISA directo, varias combinaciones de inmunorreactivos destacaron sobre el resto (combinaciones marcadas en la Tabla 3.9 y la Tabla 3.10). Por un lado, los mAbs **b#310a** y **b#310b** en combinación con el trazador competidor homólogo HRP-**b** que, al tratarse de subclones de un mismo hibridoma original, muestran un comportamiento muy similar, y destacan en las dos variantes del ELISA directo. Por otro lado, también destaca el mAb **d#115** con los dos trazadores análogos HRP-**d** y HRP-**c** en el formato directo asistido por anticuerpo de captura. Finalmente, el anticuerpo **f#223**, obtenido partir del conjugado preparado a través de la aproximación clásica, mostró un excelente valor de IC_{50} cuando se empleó junto con el conjugado heterólogo HRP-**b** como competidor en el formato directo.

Tabla 3.9. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos para OTA mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo asistido por anticuerpo de captura con trazadores enzimáticos homólogos y heterólogos.^a

mAb	HRP-a				HRP-b				HRP-c				HRP-d				HRP-e			
	[mAb] ^b	[HRP] ^c	IC ₅₀ ^d	IC ₅₀ ^d	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀ ^d	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀ ^d	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀ ^d	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀ ^d
a#118	100	30	2.62	2.58	100	30	2.42	2.30	100	30	2.42	2.30	100	100	2.30	2.30	- ^e	-	-	-
a#122	100	10	3.35	1.78	100	30	100	27.69	100	100	100	27.69	-	-	-	-	1000	100	1.95	1.95
a#125	100	10	6.74	4.41	100	10	300	1.93	300	10	1.93	2.00	300	30	2.00	-	-	-	-	-
b#39	30	10	0.41	1.20	300	3	30	0.34	30	30	0.34	0.35	100	30	0.35	-	-	-	-	-
b#41	30	100	2.41	1.14	100	10	30	1.12	30	30	1.12	1.10	100	30	1.10	-	-	-	-	-
b#310a	300	10	0.14	0.09	1000	30	1000	0.32	1000	100	0.32	0.30	1000	1000	0.30	1000	1000	1000	1000	0.18
b#310b	100	10	0.13	0.07	100	30	300	0.20	300	300	0.20	0.31	1000	1000	0.31	1000	1000	300	300	0.30
c#12	-	-	-	-	-	-	30	0.31	30	10	0.31	1.20	300	10	1.20	-	-	-	-	-
c#29	-	-	-	-	-	-	30	0.57	300	10	0.57	1.40	300	10	1.40	-	-	-	-	-
c#116	100	10	1.01	0.85	100	10	100	1.97	100	10	1.09	1.09	100	10	1.09	-	-	-	-	-
c#117	-	-	-	-	-	-	100	0.29	100	30	0.25	0.25	100	30	0.25	-	-	-	-	-
c#134	-	-	-	-	-	-	100	0.81	100	30	0.73	0.73	100	30	0.73	-	-	-	-	-
d#16	-	-	-	-	-	-	30	0.15	30	30	0.15	0.27	100	10	0.27	-	-	-	-	-
d#21	-	-	-	-	-	-	30	0.15	30	10	0.15	0.35	100	10	0.35	-	-	-	-	-
d#27	-	-	-	-	-	-	100	1.63	100	10	1.63	0.75	100	10	0.75	-	-	-	-	-
d#111	-	-	-	-	-	-	30	0.16	30	30	0.16	0.29	100	10	0.29	-	-	-	-	-
d#114	-	-	-	-	-	-	30	0.66	30	10	0.66	0.50	100	10	0.50	-	-	-	-	-
d#115	-	-	-	-	-	-	30	0.14	30	100	0.14	0.14	100	100	0.14	-	-	-	-	-
d#118	-	-	-	-	-	-	30	0.27	30	30	0.27	0.30	100	30	0.30	-	-	-	-	-
e#13	30	100	0.46	0.66	100	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	10	1.06	1.06	
e#115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	30	0.32	0.32	
f#223	30	100	0.16	0.60	300	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	10	1.06	1.06	

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} estuvieron comprendidos entre 0.7 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita. ^b Concentración de mAb en ng/mL. ^c Concentración de trazador en ng/mL. ^d Valores expresados en nM. ^e No se obtuvo señal.

Tabla 3.10. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos para OTA mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con trazadores enzimáticos homogólogos y heterólogos.^a

mAb	HRP-a				HRP-b				HRP-c				HRP-d				HRP-e			
	[mAb] ^b	[HRP] ^c	IC ₅₀ ^d	IC ₅₀ ^d	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀	[mAb]	[HRP]	IC ₅₀	IC ₅₀
a#118	1000	100	3.93	10.82	300	300	10.82	4.27	1000	100	4.27	- ^e	-	-	-	-	-	-	-	-
a#122	1000	10	5.09	1.53	300	30	1.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a#125	300	10	1.99	2.02	300	10	2.02	1.70	1000	100	1.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b#39	300	10	0.53	0.32	300	10	0.32	0.28	300	30	0.28	1000	30	0.26	-	-	-	-	-	-
b#41	300	100	1.11	1.25	1000	30	1.25	1.52	300	100	1.52	1000	100	1.57	-	-	-	-	-	-
b#310a	1000	100	0.30	0.10	1000	30	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b#310b	1000	30	0.12	0.11	1000	30	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c#12	-	-	-	-	-	-	-	0.18	100	10	0.18	100	30	0.37	-	-	-	-	-	-
c#29	-	-	-	-	-	-	-	0.43	100	30	0.43	1000	30	0.48	-	-	-	-	-	-
c#116	100	30	0.24	0.53	300	10	0.53	0.28	100	10	0.28	100	100	1.73	-	-	-	-	-	-
c#117	-	-	-	-	-	-	-	0.20	100	100	0.20	300	100	0.25	-	-	-	-	-	-
c#134	-	-	-	-	-	-	-	0.52	300	30	0.52	100	100	0.52	-	-	-	-	-	-
d#16	-	-	-	-	-	-	-	0.67	1000	10	0.67	300	30	0.29	-	-	-	-	-	-
d#21	-	-	-	-	-	-	-	0.53	300	10	0.53	300	30	0.37	-	-	-	-	-	-
d#27	-	-	-	-	-	-	-	0.87	300	30	0.87	300	30	0.56	-	-	-	-	-	-
d#111	-	-	-	-	-	-	-	0.52	300	30	0.52	300	30	0.54	-	-	-	-	-	-
d#114	-	-	-	-	-	-	-	0.84	100	10	0.84	300	30	0.24	-	-	-	-	-	-
d#115	-	-	-	-	-	-	-	0.26	300	30	0.26	300	100	0.17	-	-	-	-	-	-
d#118	-	-	-	-	-	-	-	0.33	300	30	0.33	300	100	0.26	-	-	-	-	-	-
e#13	300	30	0.80	0.64	300	30	0.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300	30	1.31	-
e#115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	100	0.27	-
f#223	100	100	0.17	0.08	300	30	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300	30	0.14	-

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} estuvieron comprendidos entre 0.7 y 1.5. Los ensayos homogólogos se muestran en negrita. ^b Concentración de mAb en ng/mL. ^c Concentración de trazador en ng/mL. ^d Valores expresados en nM. ^e No se obtuvo señal.

3.4.2.2 Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

Los resultados obtenidos durante la caracterización en este formato ELISA se muestran en la Tabla 3.11. Los valores de afinidad (IC_{50}) de todas las combinaciones homólogas fueron muy similares a los obtenidos en los formatos directos. Los resultados obtenidos para los mAbs derivados de los haptenos **b** y **d** mostraron IC_{50} inferiores a 1 nM en la mayoría de los casos., destacado de nuevo los anticuerpos derivados del hapteno **d**, que presentaron en casi todos los casos valores inferiores a 0.5 nM. Por otra parte, los valores de IC_{50} de los anticuerpos generados a partir de los haptenos **a** y **c** fueron en general superiores a los obtenida en el formato directo, salvo algunas excepciones. Por último, los anticuerpos de **e** y **f** mostraron sensibilidades similares a las obtenidas en el ELISA directo homólogo. Se ha de señalar que en este formato de ensayo el conjugado OVA-**f** sí que fue reconocido por el mAb **f#223**, además de por otros anticuerpos.

El reconocimiento de conjugados heterólogos fue más amplio al obtenido en los ensayos directos. Cabe destacar que los mAbs derivados del hapteno **d** son capaces de unirse a los conjugados OVA-**a** y OVA-**b**, mientras que no fueron capaces de reconocer a los trazadores enzimáticos HRP-**a** y HRP-**b**, aunque en todo caso las diferencias observadas en los valores de IC_{50} no fueron muy importantes. No obstante, estos anticuerpos siguen sin ser capaces de reconocer a los conjugados de los haptenos **e** y **f**. En cuanto a los anticuerpos derivados del hapteno **c**, equivalente al hapteno **d** en cuanto a la posición de funcionalización, mostraron una capacidad de reconocimiento más limitada frente a los conjugados de los haptenos **a** y **b**. Por último, los mAbs derivados de los haptenos **a** y **b** son capaces de reconocer, en mayor o menor medida, a todos los conjugados, tal y como ocurría en el formato directo asistido por anticuerpo de captura.

En este formato de ensayo, de nuevo cabe destacar los dos subclones del hibridoma **b#310**, cada uno de ellos con un conjugado heterólogo. Por otra parte, también es digno de mención el mAb **c#117**, obtenido a partir de un conjugado preparado por CuAAC, el cual dio lugar a un ensayo de elevada sensibilidad cuando se empleó junto con el conjugado competidor heterólogo OVA-**b**.

Tabla 3.11. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos para OTA mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.^a

mAb	Conjugado de tapizado																	
	OVA-a			OVA-b			OVA-c			OVA-d			OVA-e			OVA-f		
	[mAb] ^b	[OVA] ^c	IC ₅₀ ^d	[mAb]	[OVA]	IC ₅₀	[mAb]	[OVA]	IC ₅₀	[mAb]	[OVA]	IC ₅₀	[mAb]	[OVA]	IC ₅₀	[mAb]	[OVA]	IC ₅₀
a#118	100	10	6.36	30	10	6.73	100	10	7.49	30	100	14.88	- ^e	-	-	-	-	-
a#122	100	10	4.05	30	10	3.34	-	-	-	-	-	-	100	100	2.01	30	1000	5.99
a#125	30	10	3.93	30	10	5.74	30	10	3.29	30	10	2.92	-	-	-	-	-	-
b#39	30	10	0.95	30	10	0.90	100	10	2.09	100	10	1.12	-	-	-	-	-	-
b#41	30	10	1.69	30	10	2.23	100	10	3.57	100	10	2.28	-	-	-	-	-	-
b#310a	300	100	0.79	300	10	0.39	300	100	0.23	300	100	0.21	100	1000	0.09	300	1000	0.28
b#310b	100	100	0.69	100	10	0.25	100	100	0.19	100	100	0.11	100	1000	0.15	100	1000	0.14
c#12	-	-	-	-	-	-	30	10	0.39	100	10	1.51	-	-	-	-	-	-
c#29	-	-	-	-	-	-	30	10	0.69	100	10	1.84	-	-	-	-	-	-
c#116	30	10	0.38	30	10	0.53	30	10	0.58	30	10	0.54	-	-	-	-	-	-
c#117	30	1000	0.10	30	1000	0.07	30	10	0.16	30	100	0.30	-	-	-	-	-	-
c#134	-	-	-	-	-	-	30	100	0.93	30	100	0.79	-	-	-	-	-	-
d#16	100	1000	0.47	-	-	-	30	10	0.27	30	10	0.21	-	-	-	-	-	-
d#21	30	1000	0.18	30	1000	0.13	30	10	0.44	30	10	0.27	-	-	-	-	-	-
d#27	30	1000	1.16	100	1000	1.19	30	10	0.96	30	10	1.15	-	-	-	-	-	-
d#111	30	1000	0.16	100	1000	0.45	30	10	0.29	30	10	0.20	-	-	-	-	-	-
d#114	30	1000	0.46	100	1000	0.59	30	10	0.85	30	10	0.39	-	-	-	-	-	-
d#115	-	-	-	-	-	-	100	100	0.60	100	100	0.56	-	-	-	-	-	-
d#118	100	1000	0.62	100	1000	0.45	30	100	1.09	30	100	0.46	-	-	-	-	-	-
e#13	100	100	2.05	30	100	1.80	300	1000	2.51	-	-	-	30	100	1.40	100	100	1.87
e#115	100	1000	0.45	100	1000	0.28	-	-	-	-	-	-	30	100	0.23	30	1000	0.39
f#223	30	1000	0.63	30	100	0.16	-	-	-	-	-	-	30	1000	0.34	30	1000	0.19

^a Los valores de IC₅₀ son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A_{max} estuvieron comprendidos entre 0.7 y 1.5. Los ensayos homólogos se muestran en negrita.

^b Concentración de mAb en ng/mL. ^c Concentración de conjugado en ng/mL. ^d Valores expresados en nM. ^e No se obtuvo señal.

3.4.3 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales

Este estudio se realizó empleando la misma estrategia previamente descrita para los antisueros de conejo, *i.e.*, se determinó la reactividad cruzada de todos los monoclonales hacia las otras dos ocratoxinas, OTB y OTC. La especificidad se evaluó mediante ELISA competitivo indirecto con conjugado homólogo en las condiciones óptimas determinadas para cada pareja de inmunorreactivos. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales generados para OTA.^a

mAb	Reactividad cruzada (%)		mAb	Reactividad cruzada (%)	
	OTB	OTC		OTB	OTC
a#118	4.5	4.8	d#16	1.7	-
a#122	3.1	12.6	d#21	2.2	-
a#125	0.1	- ^b	d#27	-	-
b#39	-	-	d#111	87.9	0.6
b#41	1.0	1.1	d#114	-	-
b#310a	0.7	-	d#115	58.7	1.3
b#310b	1.1	0.3	d#118	18.1	-
c#12	1.0	-	e#13	5.1	403.9
c#29	7.5	-	e#115	51.3	55.4
c#116	2.9	0.2	f#223	26.8	11.8
c#117	4.4	20.8			
c#134	13.2	-			

^a Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes. Las diferencias estructurales con OTA se muestran en rojo. ^b Reconocimiento inferior al 0.1%.

Como se puede observar, el comportamiento en términos de especificidad fue muy variado. No obstante, se aprecian ciertos patrones de reconocimiento en función de la posición del brazo espaciador en los haptenos empleados como inmunógenos. En el caso de los mAbs derivados de los haptenos **a** y **b**, que presentan el brazo espaciador en el anillo aromático del fragmento de Phe, la afinidad hacia OTB y OTC fue muy baja, mayoritariamente por debajo del 1%. Estos resultados muestran la importancia en el reconocimiento en este grupo de anticuerpos tanto del grupo carboxilo como del átomo de cloro presentes en la estructura de OTA.

Por otra parte, el comportamiento de los anticuerpos procedentes de los haptenos **d** y **c** también fue similar; varios de ellos presentaron cierto reconocimiento hacia OTB y bajo o nulo reconocimiento hacia OTC. Esta capacidad de reconocimiento, más o menos generalizada, de OTB por parte de estos anticuerpos puede explicarse atendiendo al fragmento de la estructura de OTA que mejor exponen ambos haptenos, *i.e.*, el fragmento de Phe, y que presentan en común ambas micotoxinas. Por último, en el caso de los anticuerpos derivados de los haptenos **e** y **f**, era de

esperar una elevada capacidad de reconocimiento hacia OTC, debido a que en dichos haptenos se simula el grupo etoxicarbonilo presente en esta micotoxina. Esto fue claramente así en el caso del mAb **e#13**, el cual es capaz de reconocer a OTC con una afinidad 4 veces superior a la mostrada hacia OTA, mientras que el mAb **e#115** mostró un reconocimiento similar por OTB y OTC, y solo 2 veces peor que el exhibido hacia OTA. Por último, el mAb **f#223** también reconoció a OTB y OTC, aunque en menor medida que el mAb **e#115**.

3.5 OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS ELISA

Una vez generados y caracterizados los anticuerpos, se seleccionaron las parejas de inmunorreactivos que dieron lugar a los mejores inmunoensayos competitivos. Atendiendo a la influencia que las propiedades fisicoquímicas del medio de ensayo pueden ejercer sobre la interacción del anticuerpo con el analito y el conjugado de ensayo durante la etapa competitiva, se evaluaron algunas de las variables más importantes, como son pH, fuerza iónica y presencia de ciertos disolventes orgánicos durante la etapa de competición.

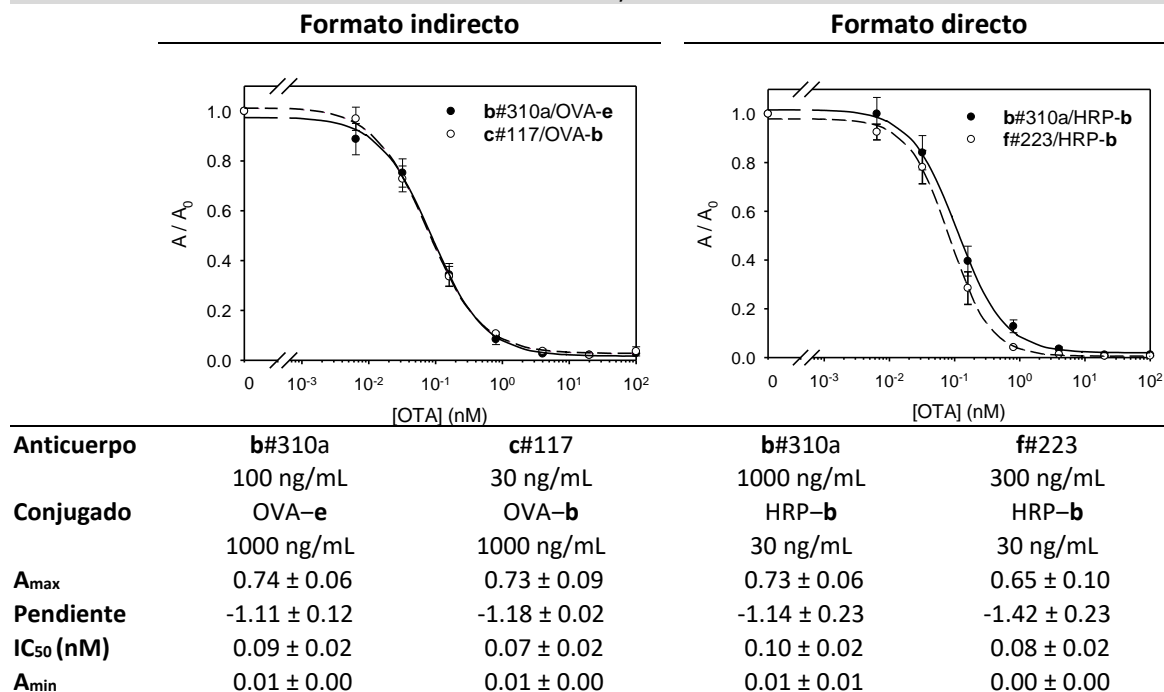
3.5.1 Selección de inmunoensayos

La selección de los inmunoensayos competitivos se hizo atendiendo en primer lugar a la afinidad y especificidad de los anticuerpos, primando la selección de las parejas anticuerpo/conjugado que dieran lugar a los ensayos con la mayor sensibilidad (menores valores de IC_{50}). En segundo lugar, se tuvieron en cuenta criterios prácticos, tales como el consumo de inmunorreactivos, productividad del hibridoma, valores de pendiente en las curvas de inhibición cercanos a la unidad para garantizar un buen compromiso entre la exactitud del ensayo y el rango de trabajo, o el número de etapas de ensayo.

Teniendo en cuenta todos estos criterios, se decidió seleccionar los dos mejores ensayos en los formatos directo e indirecto, descartando el formato directo asistido por anticuerpo de captura debido a que no presentaba mejoras significativas de sensibilidad con respecto al ensayo directo. En el caso del formato de ELISA indirecto se continuó trabajando con el anticuerpo **c#117** y el conjugado heterólogo OVA-**b** como competidor, pareja de inmunorreactivos con la que se alcanza una IC_{50} de 0.07 nM, cifra próxima a la obtenida en el segundo ensayo seleccionado, el basado en el anticuerpo **b#310a** junto con el conjugado heterólogo OVA-**e**. Por lo que respecta al formato directo, los ensayos seleccionados fueron los basados en los mAbs **b#310a** y **f#223**, ambos con el trazador HRP-**b**. Tal y como se muestra en la Tabla 3.13, la sensibilidad de los cuatro ensayos preseleccionados es muy similar, siendo la IC_{50} de todos ellos igual o inferior a 0.10 nM. Por último, se ha de señalar que, empleando las concentraciones de inmunorreactivos indicadas en la tabla, la

señal máxima de todos los ensayos seleccionados fue relativamente baja, circunstancia menor que puede ser posteriormente solventada mediante tiempos de incubación superiores durante la etapa de revelado o mediante el uso de sustratos cromogénicos más eficientes.

Tabla 3.13. Características de los inmunoensayos ELISA seleccionados.^a



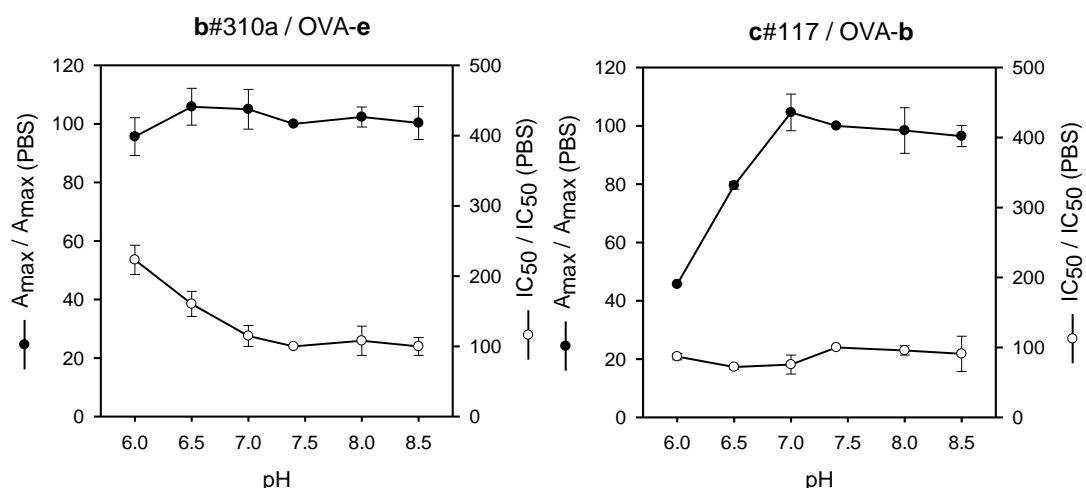
^a Los valores son la media de tres determinaciones independientes.

3.5.1.1 Optimización del pH y de la fuerza iónica

Hasta este punto, todos los ensayos habían sido llevados a cabo en tampón fosfato salino (PBS), es decir, condiciones fisiológicas de pH (7.4) y fuerza iónica (166 mM). No obstante, variaciones en estos parámetros podrían modificar la afinidad del anticuerpo hacia el conjugado competidor y el propio analito, dando lugar a variaciones en el valor de IC₅₀. Con el objetivo de optimizar estos parámetros físico-químicos y así intentar conseguir un ensayo más sensible, se llevaron a cabo dos estudios paralelos en los que una de estas variables se fijaba en su valor fisiológico a la vez que la segunda de ellas se evaluaba.

La optimización del valor de pH se llevó a cabo comparando los valores de A_{max} e IC₅₀ de curvas de inhibición obtenidas a partir de la mezcla de una curva estándar de OTA preparada en agua MilliQ con disoluciones del inmunorreactivo, anticuerpo en el formato indirecto y trazador en el formato directo, en tampones fosfato con distinto pH. El rango evaluado estuvo comprendido entre 6.0 y 8.5, y los tampones fueron preparados de manera que todos tuviesen la misma concentración (20 mM) y fuerza iónica (332 mM). La Figura 3.6 muestra la variación relativa de los valores de A_{max} e IC₅₀ de los cuatro inmunoensayos seleccionados respecto a los valores obtenidos en las condiciones de referencia, es decir, en PBS (pH 7.4).

ENSAYOS INDIRECTOS



ENSAYOS DIRECTOS

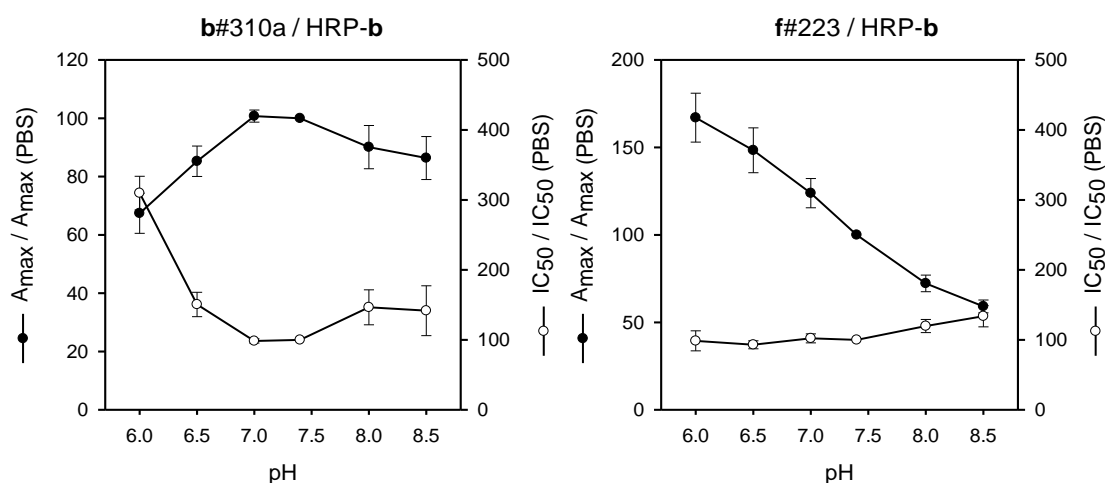


Figura 3.6. Influencia del pH sobre los valores de A_{max} e IC_{50} de los cuatro inmunoensayos. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres determinaciones independientes.

El efecto del pH fue muy marcado en los cuatro inmunoensayos. No obstante, ninguna de las condiciones evaluadas dio lugar a un descenso del valor de IC_{50} con respecto a las condiciones de referencia. De hecho, incluso se produjo un aumento de la misma a valores bajos de pH en los dos ensayos en los que participaba el mAb **b#310a**. Por lo que respecta a la señal máxima de ensayo, pHs ácidos produjeron un descenso de la misma en el ensayo indirecto **c#117/OVA-b** y en el ensayo directo **b#310a/HRP-b**. Por último, mientras que la A_{max} parece ser independiente del pH en el ensayo **b#310a/OVA-e**, la señal del ensayo directo **f#223/HRP-b** mostró una gran dependencia.

La optimización del valor de la fuerza iónica se llevó a cabo mediante un estudio similar, donde los inmunorreactivos se prepararon en tampón fosfato 20 mM, pH 7.4, con concentraciones variables de NaCl. Se cubrió así un rango de valores de fuerza iónica desde 100 hasta 560 mM. En

la Figura 3.7 se muestra la influencia de este parámetro como variación relativa respecto a PBS ($I = 166 \text{ mM}$).

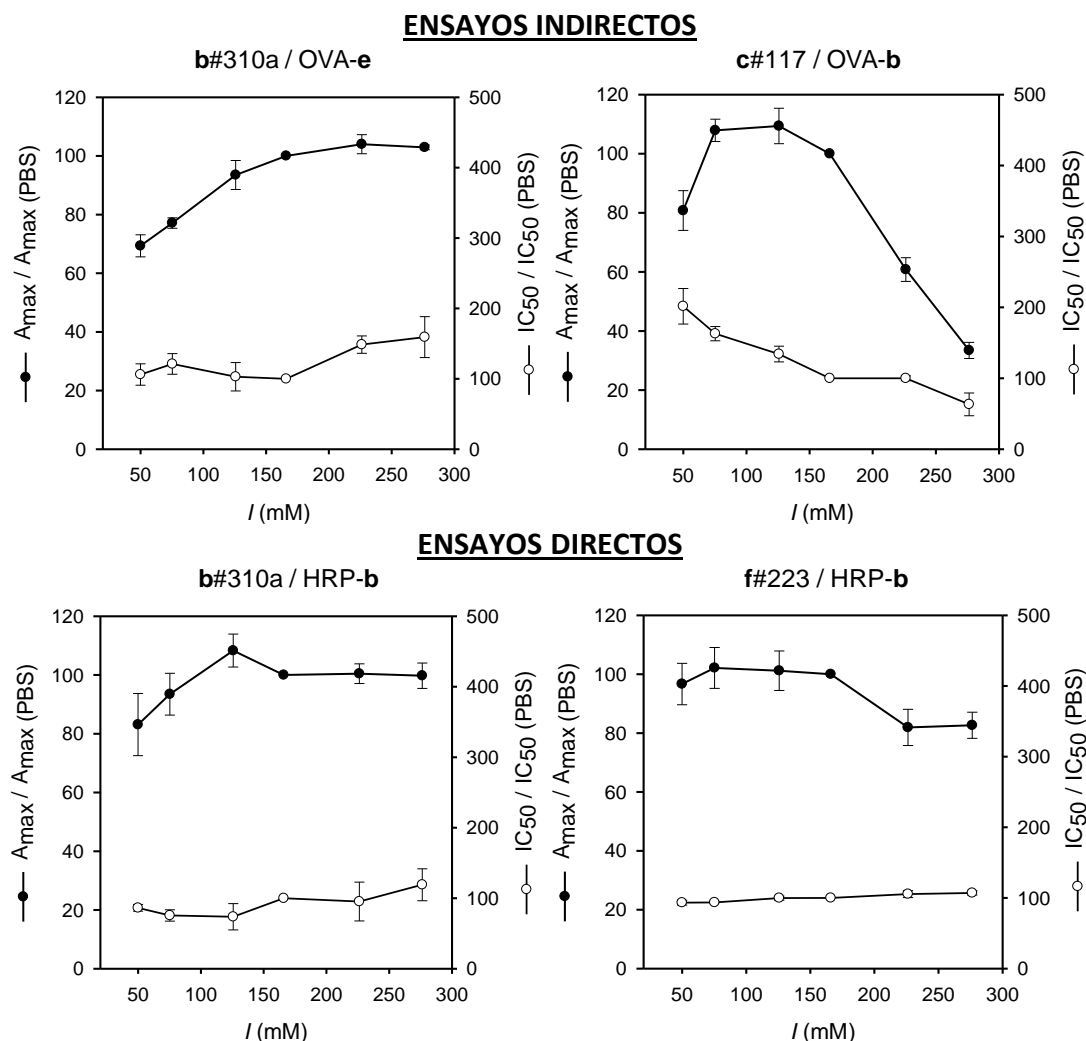


Figura 3.7. Influencia de la fuerza iónica sobre valores de A_{max} e IC_{50} de los cuatro inmunoensayos. Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres determinaciones independientes.

En el caso de la fuerza iónica, los dos ensayos directos mostraron una elevada tolerancia a la variación de este parámetro, pero sin producirse una mejora de sensibilidad en ninguno de los casos. Por el contrario, ambos ensayos indirectos sí que se vieron afectados. En el caso del ensayo **b#310a/OVA-e** se produjo una pérdida de señal a bajas concentraciones de NaCl sin obtenerse una mejora de la sensibilidad. Este mismo efecto se observó para el segundo ensayo indirecto, **c#117/OVA-b**, en valores extremos de este parámetro.

A la vista de estos resultados, y dado que no se produjo ninguna mejora significativa en términos de sensibilidad en ninguno de los cuatro ensayos bajo ninguna de las condiciones evaluadas, se decidió continuar trabajando en condiciones fisiológicas. No obstante, la baja concentración del tampón (10 mM) no garantizaba una correcta neutralización de las muestras de

vino y zumo que posteriormente se analizarían. Por este motivo, se decidió sustituir el PBS por tampón fosfato 75 mM, tampón que ajustado a pH 7.4 presenta la misma fuerza iónica que el PBS (166 mM).

3.5.1.2 Influencia de disolventes orgánicos

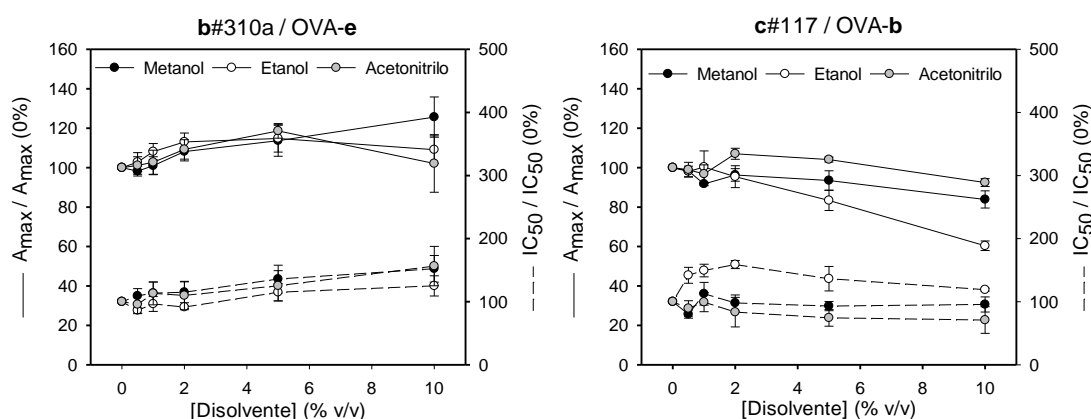
En el análisis de alimentos, con frecuencia resulta necesario un proceso previo que permita la extracción y limpieza de la muestra a analizar. Dicho proceso habitualmente implica el uso de disolventes orgánicos para extraer cuantitativamente el analito, por lo que el ensayo tendría lugar en presencia de una cierta concentración del disolvente extractor, circunstancia que puede afectar a las características del ensayo. Por ello, se llevó a cabo un estudio de tolerancia a la presencia de dos disolventes de extracción habituales, como son el metanol y el acetonitrilo, y también a la del etanol, dado que los inmunoensayos pretendían aplicarse a muestras de vino, como se describirá posteriormente.

Para llevar a cabo el estudio, se prepararon curvas estándar de OTA en agua MilliQ con diferentes concentraciones del disolvente orgánico a evaluar, y se añadió el inmunorreactivo de competición, anticuerpo en el formato indirecto y trazador en el formato directo, disuelto en tampón fosfato 150 mM con 0.05% (v/v) de Tween-20. En la Figura 3.8 se muestran los resultados de este estudio para los cuatro ensayos seleccionados.

El efecto de los tres disolventes evaluados fue diferente en función del formato ELISA empleado. En el caso de los dos ensayos indirectos, el efecto de bajas concentraciones de disolvente sobre A_{max} e IC_{50} no fue muy acusado. Por el contrario, en el caso de los ensayos directos, el efecto de estos disolventes sí resultó ser importante; concentraciones superiores al 5% de cualquiera de ellos originaron una pérdida de señal máxima y de sensibilidad en ambos ensayos. Destaca especialmente el efecto del acetonitrilo, donde una concentración del 5% origina un descenso de alrededor de un 40% de la señal y triplica la IC_{50} en el caso del ensayo con el mAb **b#310a**, o incluso impide la competición en el caso del mAb **f#223**.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que los ELISAs indirectos mostraron una mayor tolerancia a la presencia de disolventes que los ELISAs directos. De cualquier modo, resulta aconsejable reducir al máximo la presencia de disolventes en el ensayo a fin de no alterar sus características analíticas, lo que obligará a diluir adecuadamente los extractos con tampón antes del análisis. En el caso de determinaciones en vino, aunque no sea imprescindible una etapa de extracción, también será conveniente diluir las muestras de forma que la concentración de etanol durante el ensayo no interfiera en la cuantificación de OTA.

ENSAYOS INDIRECTOS



ENSAYOS DIRECTOS

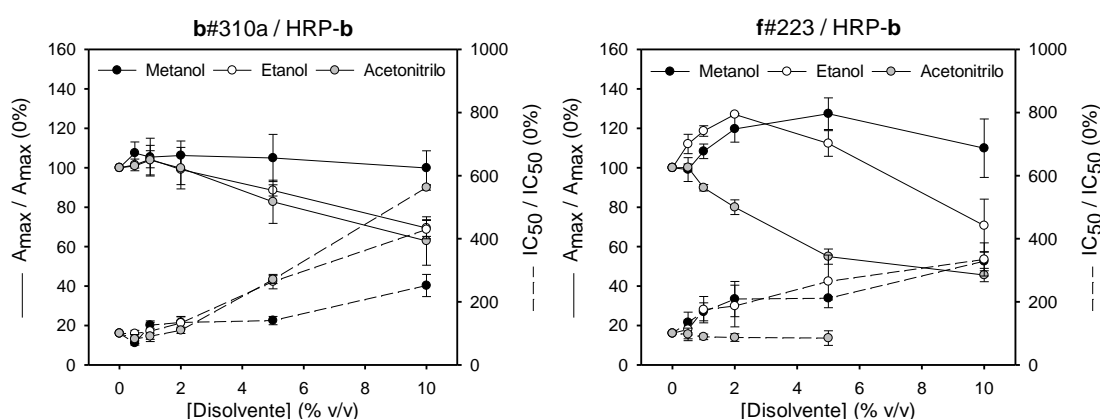


Figura 3.8. Tolerancia de los inmunoensayos seleccionados a la presencia de disolventes orgánicos. Las concentraciones de disolvente representadas son en ensayo y son la media de tres determinaciones independientes.

3.5.2 Aplicación de los inmunoensayos

Con el objetivo de evaluar la exactitud y la precisión de los diferentes ensayos seleccionados a la hora de cuantificar OTA, se comenzó estudiando el efecto matriz de vino y zumo sobre los parámetros analíticos de los ensayos seleccionados; posteriormente, se cuantificó OTA en muestras dopadas con concentraciones conocidas, y finalmente se analizó una muestra que contenía OTA de manera natural y cuya concentración había sido certificada por un organismo internacional de referencia. Una vez evaluada su aplicabilidad, se procedió al análisis de muestras de vino y zumo comerciales para evaluar la incidencia de esta micotoxina.

3.5.2.1 Estudio del efecto matriz

Es habitual que en el caso de muestras complejas algunos componentes interfieran en la correcta detección del analito de interés e impidan su correcta cuantificación, dando lugar al conocido como efecto matriz. En el caso de los métodos ELISA, en muchas ocasiones una adecuada dilución de la muestra, o del extracto de esta, suele ser suficiente para eliminar dicho efecto. Por

ello, y partiendo de la base de que muy probablemente no sería posible la medida directa, se determinó la dilución mínima necesaria para eliminar dicho efecto matriz sobre los inmunoensayos seleccionados. Para ello, se ensayaron curvas estándar preparadas con concentraciones crecientes de la matriz estudiada, y se compararon con la curva estándar en tampón. Las curvas de analito se prepararon en diluciones de las muestras en agua MilliQ (diluciones 1/5, 1/15, 1/50, 1/1.5·10² y 1/5·10²) y se mezclaron con el correspondiente inmunorreactivo disuelto en tampón fosfato 150 mM, 0.05% (v/v) de Tween-20, pH 7.4.

A modo de ejemplo, la Figura 3.9 (izquierda) muestra el efecto matriz del vino tinto sobre las curvas de inhibición del inmunoensayo directo basado en el mAb **b#310a**. Este efecto matriz fue similar en los cuatro ensayos para las cuatro matrices de trabajo (vinos y zumos tintos y blancos): un aumento en la proporción de matriz originó un descenso de la señal, efecto que, en un análisis cuantitativo, se traduciría en una sobreestimación del valor real de OTA. Por otra parte, la Figura 3.9 (derecha) muestra la variación de la señal máxima en función de la dilución de matriz empleada. En ella puede apreciarse la pérdida significativa de señal cuando la dilución es inferior a 1/10², mientras que con diluciones superiores el valor de A_{max} queda dentro del intervalo de fiabilidad, establecido arbitrariamente en ± 0.2 unidades de absorbancia.

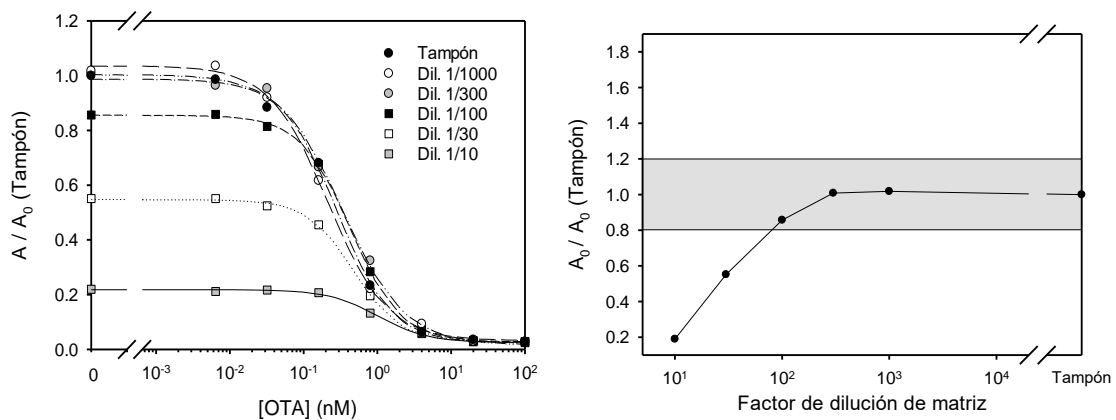


Figura 3.9. Efecto del vino tinto sobre el ensayo directo **b#310a/HRP-b**. Izquierda: curvas de inhibición en presencia de diferentes diluciones de la matriz. Derecha: evolución de la A_{max} obtenida en cada curva con matriz. Las diluciones de la matriz mostradas en ambas gráficas son en ensayo. Las señales fueron normalizadas con respecto a la absorbancia en ausencia de OTA de la curva en tampón.

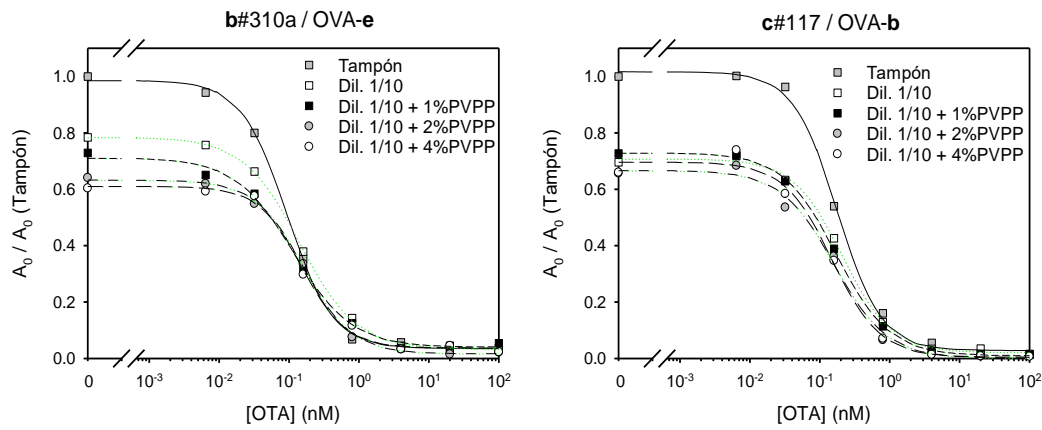
Así pues, se pudo concluir que mediante dilución no era posible alcanzar los límites máximos establecidos para OTA en vino y zumo de uva (2 ng/mL), dado que dicho límite queda fuera del rango de los cuatro ensayos tras la dilución de la muestra. Por lo tanto, para alcanzar los límites de detección deseados, fue necesario realizar un tratamiento complementario a la dilución que permitiese la eliminación del efecto matriz y así alcanzar límites de cuantificación más bajos.

Una de las estrategias más empleadas para la purificación y extracción de OTA en vino, tal y como se comentó en la introducción, es el uso de columnas de inmunoafinidad. No obstante, este tipo de columnas son una herramienta cara y relativamente lenta que, en principio, jugaría en contra de la principal ventaja de los métodos ELISA: su rapidez y simplicidad. Una alternativa a estas columnas es el uso de agentes clarificantes que permiten la eliminación de los componentes coloreados del vino (taninos y polifenoles). Entre los más comúnmente empleados destacan el PEG^{82,236,237} y la poli(vinilpirrolidona) (PVPP),²³⁸⁻²⁴⁰ siendo este último de especial interés en la industria vitivinícola para llevar a cabo la clarificación de vinos destinados al consumo.

Por ello, se optó por evaluar un procedimiento consistente en la dilución de la muestra y el posterior tratamiento de la misma con PVPP. Para evaluar el efecto de este agente clarificante, las curvas estándar de OTA se prepararon en diluciones 1/10 de la muestra en agua MilliQ tratadas con distintas concentraciones de PVPP (0, 1, 2 y 4% (p/v)), y se mezclaron con el correspondiente inmunorreactivo preparado en tampón fosfato 150 mM. Las curvas de inhibición obtenidas bajo estas condiciones se compararon con la curva de referencia en tampón. Debido a su mayor coloración, se evaluaron inicialmente el vino y zumo tintos. A modo de ejemplo, en la Figura 3.10 se muestran las curvas obtenidas para los cuatro ensayos en vino tinto. Las curvas correspondientes al zumo tinto se encuentran en el Anexo C.

El uso de PVPP no supuso una mejora en ninguno de los ensayos indirectos, obteniéndose curvas de inhibición equivalentes a las obtenidas mediante simple dilución. Por el contrario, sí que se observó una mejora en el caso de los ensayos directos. En el ensayo basado en el mAb **b#310a** se obtuvieron curvas equivalentes para las tres concentraciones ensayadas, pero sin llegar a igualar a la curva obtenida en tampón. Sin embargo, en el caso del ensayo basado en el mAb **f#223**, donde el efecto matriz de partida era mucho menor, las curvas fueron equivalentes a la obtenida en el tampón de referencia, siendo un 1% de PVPP suficiente para eliminar el efecto matriz sobre este ensayo. En el caso del zumo tinto, los resultados obtenidos fueron similares: únicamente el ensayo **f#223/HRP-b** dio lugar a una curva que se aproximase a la obtenida en tampón, en este caso empleando una concentración de PVPP del 4%.

ENSAYOS INDIRECTOS



ENSAYOS DIRECTOS

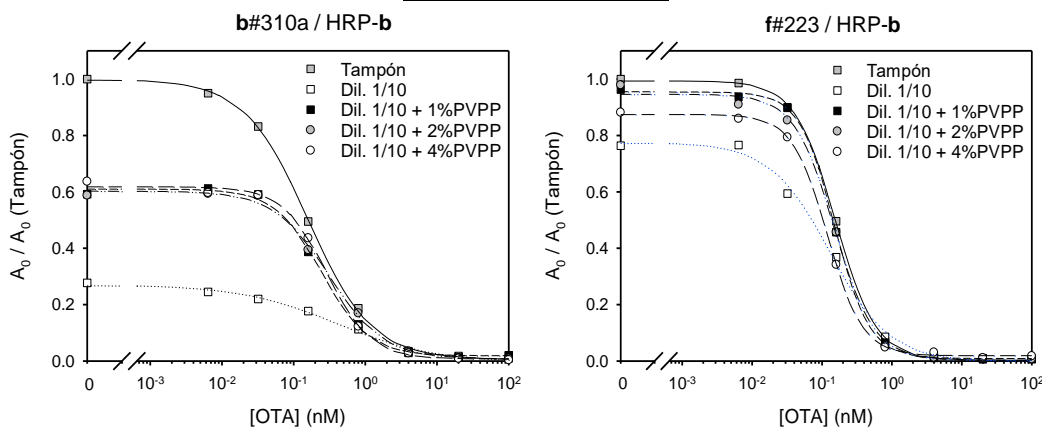


Figura 3.10. Efecto del vino tinto diluido 1/10 y tratado con PVPP sobre los cuatro ensayos seleccionados. La dilución de matriz mostrada es antes de ensayo. Las señales fueron normalizadas con respecto a la absorbancia en ausencia de OTA de la curva en tampón.

Las condiciones de tratamiento establecidas para vino y zumo tinto se aplicaron a las muestras de vino y zumo blanco, asumiendo que, debido a la menor complejidad de este tipo de matrices, la reducción del efecto matriz sería similar o incluso mayor. En la Figura 3.11 se muestra el aspecto de las cuatro matrices tras la dilución 1/10 en el tampón de trabajo y el posterior tratamiento de estas con PVPP.

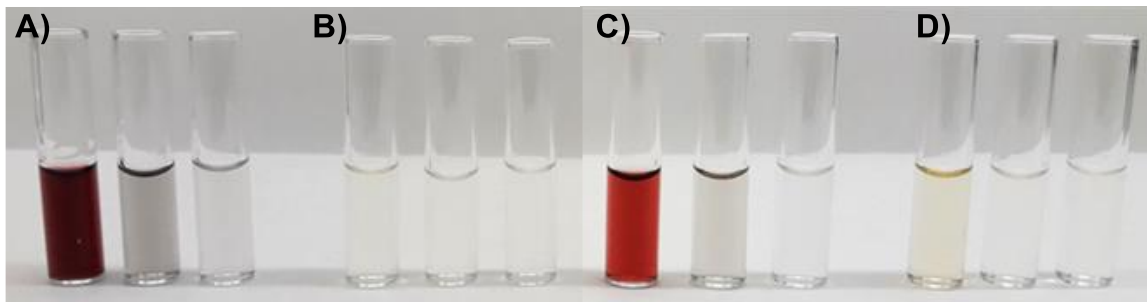


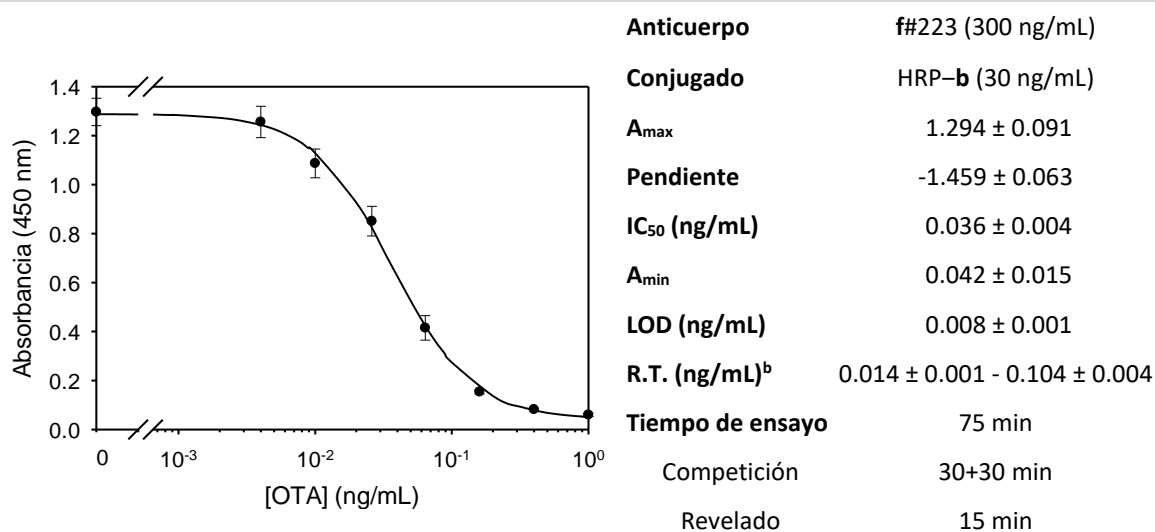
Figura 3.11. Muestras de vino (A y B) y zumo (C y D) tras diluirlas 1/10 en tampón y tras tratamiento con 1% de PVPP para el caso de vinos y 4% de PVPP para zumos.

En consecuencia, los resultados obtenidos nos llevaron a seleccionar el ensayo directo **f#223/HRP-b** para posteriores estudios, ya que esta combinación de inmunorreactivos resultó ser la menos sensible al efecto matriz de las muestras de interés.

3.5.2.2 Selección y optimización del ensayo final

Antes de proceder al estudio de recuperaciones en muestras dopadas, se optimizó la señal máxima del ensayo seleccionado, ya que, hasta este punto, todos los ensayos habían sido llevados a cabo empleando OPD como sustrato enzimático, dando lugar a una señal máxima de ensayo de alrededor de 0.7. Una alternativa común a la OPD es el TMB, que permite obtener señales más elevadas. Este sustrato incoloro da lugar a una diimina de color azul que, tras la adición de ácido sulfúrico, pasa a color amarillo con un máximo de absorción a 450 nm. Una segunda alternativa para lograr una señal más elevada es emplear tiempos de incubación superiores en presencia del sustrato, permitiendo así una mayor formación de producto. La aplicación de ambas estrategias sobre el ensayo directo basado en la pareja de inmunorreactivos **f#223/HRP-b** dio lugar al inmunoensayo cuyas características se muestran en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Características optimizadas del ensayo ELISA directo seleccionado.^a



^a Los valores son la media de 3 determinaciones independientes. ^b Rango de trabajo calculado como el intervalo IC₂₀-IC₈₀.

Bajo estas nuevas condiciones se consiguió duplicar la señal máxima sin modificar la sensibilidad del ensayo, estando el rango de trabajo comprendido entre 0.014 y 0.104 ng/mL. Este rango, combinado con el tratamiento propuesto para las muestras de vino y zumo (dilución final en ensayo de 1/20 tras adición de PVPP), permitiría la cuantificación de OTA a niveles inferiores al límite establecido por la CE para estas dos matrices. Por último, el tiempo de ensayo se estableció en 75 min, donde la etapa competitiva, en la que se optó por añadir los reactivos de forma

secuencial, tiene lugar durante 60 min; en primer lugar, se añade la disolución estándar de OTA, y tras una incubación de 30 min y sin lavar la microplaca, se agrega el competidor HRP–b.

3.5.2.3 Análisis de muestras fortificadas

Una vez optimizado, el ensayo se aplicó al análisis de muestras dopadas con cantidades conocidas de OTA. Para ello, vinos y zumos comerciales fueron suplementados a niveles de dopaje centrados en el límite máximo marcado por la CE, es decir, a 0.5, 1, 2, 5, 10 y 20 ng/mL. Además, debido a la complejidad y potencial variabilidad de este tipo de matrices, se decidió trabajar con un total de 10 muestras, 6 vinos y 4 zumos. Tras el dopaje, las muestras fueron tratadas de acuerdo al procedimiento descrito en la sección anterior, siendo necesaria una dilución 1/10 adicional en el caso de las muestras fortificadas con más de 2 ng/mL para adecuarlas al rango de trabajo del ensayo. Una vez analizadas, se evaluó la concordancia de los resultados obtenidos con respecto a las concentraciones de dopaje mediante el cálculo de los valores de recuperación (R). Por otra parte, se consideró como límite de cuantificación la concentración más baja ensayada con la que se obtuvo una recuperación en el intervalo de 80% a 120%, y a su vez con un coeficiente de variación inferior al 20%. Las recuperaciones obtenidas para el conjunto de muestras seleccionado se recopilan en la Tabla 3.15.

Tabla 3.15. Recuperaciones de OTA obtenidas mediante el ensayo ELISA competitivo directo desarrollado en muestras de vino y zumo de uva.^a

	[OTA] ^b	R(%) ^c Vino 1	R(%) Vino 2	R(%) Vino 3	R(%) Zumo 1	R(%) Zumo 2
Tinto	0.5	107 ± 6	102 ± 4	98 ± 15	121 ± 11	127 ± 12
	1	98 ± 9	100 ± 7	94 ± 12	106 ± 5	119 ± 7
	2	102 ± 14	94 ± 8	102 ± 8	118 ± 9	122 ± 2
	5	95 ± 20	98 ± 9	112 ± 11	107 ± 13	82 ± 6
	10	95 ± 13	101 ± 2	102 ± 3	93 ± 4	82 ± 7
	20	93 ± 6	95 ± 3	96 ± 6	95 ± 7	102 ± 1
	[OTA]	R(%) Vino 4	R(%) Vino 5	R(%) Vino 6	R(%) Zumo 3	R(%) Zumo 4
Blanco	0.5	101 ± 12	94 ± 12	92 ± 24	116 ± 3	130 ± 5
	1	89 ± 10	94 ± 11	107 ± 13	98 ± 6	109 ± 8
	2	90 ± 8	94 ± 12	119 ± 17	106 ± 13	111 ± 2
	5	103 ± 14	94 ± 5	111 ± 2	101 ± 14	83 ± 1
	10	110 ± 4	104 ± 7	109 ± 8	86 ± 11	83 ± 10
	20	101 ± 6	91 ± 5	97 ± 3	86 ± 6	87 ± 7

^a Los valores corresponden a la media de cuatro determinaciones independientes. ^b Concentración de fortificación de OTA expresada en ng/mL. ^c Valores de recuperación y desviación estándar.

A la vista de los resultados recogidos en la tabla superior, podemos afirmar que el ELISA desarrollado (f#223/HRP–b) permitió cuantificar OTA correctamente en todas las muestras estudiadas. La determinación fue especialmente exacta y precisa en el caso de los seis vinos, con recuperaciones en el rango 90 – 110% y coeficientes de variación inferiores al 20% en la mayoría de los casos. Por lo que respecta a los zumos, el ensayo también mostró muy buen

comportamiento, si bien con recuperaciones algo elevadas a bajas concentraciones de OTA, pero en todo caso dentro de límites aceptables. Además, a modo de control, se analizó un Material de Referencia Europeo consistente en un vino tinto con un contenido acreditado de OTA de 0.52 ± 0.11 ng/mL. El valor obtenido para esta muestra fue de 0.50 ± 0.05 ng/mL ($n=4$). Globalmente considerados, estos resultados prueban de manera fehaciente la validez del inmunoensayo desarrollado para la cuantificación de OTA a concentraciones incluso inferiores al contenido máximo establecido por la CE. Por último, se analizaron 70 muestras de vino y 17 muestras de zumo con el fin de evaluar el grado de incidencia de OTA en productos comerciales (Tabla 3.16).

Tabla 3.16. Contenido de OTA determinado mediante el ELISA desarrollado f#223/HRP-b en muestras comerciales de vino y zumo de uva.^a

Muestra ^b	[OTA] ^c	Muestra	[OTA]	Muestra	[OTA]
VT 1	< LOD ^d	VT 30	< LOD	VB 9	< LOD
VT 2	< LOD	VT 31	0.28 ± 0.03	VB 10	< LOD
VT 3	< LOD	VT 32	< LOD	VB 11	< LOD
VT 4	< LOD	VT 33	< LOD	VB 12	< LOD
VT 5	< LOD	VT 34	< LOD	VB 13	< LOD
VT 6	< LOD	VT 35	< LOD	VB 14	< LOD
VT 7	< LOD	VT 36	< LOQ	VB 15	< LOD
VT 8	< LOD	VT 37	< LOD	VB 16	< LOD
VT 9	< LOD	VT 38	< LOD	VB 17	< LOD
VT10	< LOD	VT 39	< LOD	VB 18	< LOD
VT 11	< LOD	VT 40	< LOD	VB 19	< LOD
VT 12	< LOD	VT 41	< LOD	VB 20	< LOD
VT13	< LOD	VT 42	< LOQ	ZT 1	0.49 ± 0.15
VT 14	< LOD	VT 43	< LOD	ZT 2	1.38 ± 0.17
VT 15	0.34 ± 0.02	VT 44	< LOD	ZT 3	0.65 ± 0.03
VT 16	< LOD	VT 45	< LOD	ZT 4	0.36 ± 0.12
VT 17	< LOD	VT 46	< LOD	ZT 5	0.40 ± 0.02
VT 18	< LOD	VT 47	< LOD	ZT 6	0.36 ± 0.05
VT 19	< LOD	VT 48	< LOD	ZT 7	< LOQ
VT 20	< LOD	VT 49	< LOD	ZT 8	0.49 ± 0.10
VT 21	< LOD	VT 50	< LOD	ZT 9	0.66 ± 0.04
VT 22	< LOD	VB 1	< LOD	ZB 1	0.43 ± 0.11
VT 23	< LOD	VB 2	< LOD	ZB 2	0.33 ± 0.06
VT 24	< LOD	VB 3	< LOD	ZB 3	0.63 ± 0.03
VT 25	< LOD	VB 4	< LOD	ZB 4	0.36 ± 0.06
VT 26	< LOD	VB 5	< LOD	ZB 5	0.65 ± 0.09
VT 27	< LOD	VB 6	< LOD	ZB 6	0.49 ± 0.03
VT 28	0.52 ± 0.10	VB 7	< LOD	ZB 7	< LOD
VT 29	< LOQ ^e	VB 8	< LOD	ZB 8	0.37 ± 0.02

^a Los valores corresponden a la media de dos determinaciones independientes. ^b VT: vino tinto, VB: vino blanco, ZT: zumo tinto, ZB: zumo blanco. ^c Concentración en ng/mL. ^d Valor inferior al límite de detección del método (0.16 ng/mL). ^e Valor inferior al límite de cuantificación del método (0.28 ng/mL).

La gran mayoría de las muestras de vino mostraron valores inferiores al LOD. Únicamente seis muestras de vino tinto presentaron valores detectables de OTA, siendo posible cuantificar su concentración en tres de ellas (VT 15, VT 28 y VT 31). En el caso de los zumos, casi todas las

muestras mostraron concentraciones de OTA próximas a 0.5 ng/mL. No obstante, se ha de tener en cuenta que en los estudios de recuperación el ensayo mostró una ligera tendencia a sobreestimar cuando se cuantifican concentraciones bajas de OTA en este tipo de matriz, por lo que estas muestras podrían contener concentraciones de esta micotoxina inferiores a las indicadas en la Tabla 3.16. Tan solo una muestra de zumo contuvo OTA a niveles detectables con fiabilidad: el zumo tinto 2 (ZT 2), con un valor de 1.4 ng/mL, valor ciertamente elevado, aunque inferior al límite legal. Esta muestra de zumo fue analizada por el Laboratorio de Salud Pública de Valencia mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de masas (LC-MS/MS), metodología con la que alcanzan un límite de detección de 1 ng/mL en este tipo de matriz. La concentración de OTA obtenida mediante esta aproximación fue de 1.2 ng/mL, resultado coherente al obtenido mediante el ensayo ELISA desarrollado.

3.6 DESARROLLO DE TIRAS INMUNORREACTIVAS

Para el desarrollo de tiras inmunorreactivas capaces de detectar OTA en muestras de vino y zumo de uva, se procedió de forma similar a la descrita en las secciones previas para el desarrollo del método ELISA. El primer paso fue la caracterización de los anticuerpos frente a diversos conjugados competidores, seguido de la evaluación de parámetros como pH, fuerza iónica o porcentaje de etanol para, por último, aplicar el ensayo desarrollado a muestras con una concentración de OTA conocida.

En este formato de ensayo, los anticuerpos se inmovilizaron sobre nanopartículas de oro de 40 nm que dan lugar a bandas de color rojizo fácilmente distinguibles sobre el color blanco de la membrana. Además, con el objetivo de asegurar su actividad, se decidió trabajar con nanopartículas previamente modificadas con anticuerpo secundario GAM. Por otra parte, el material seleccionado para la membrana fue nitrocelulosa con alta capacidad de fijación de proteínas y un tamaño de poro de 15 μm , permitiendo tiempos de ensayo cortos. Por último, se decidió prescindir de la almohadilla de conjugado (donde se absorbería el conjugado NP@mAb) y trabajar en formato *dipstick*.^{148,241} En este formato, la disolución del conjugado NP@mAb se mezcla con la muestra que contiene el analito y, tras un tiempo de incubación, la tira inmunorreactiva se introduce en posición vertical, de forma que la muestra será absorbida y migrará por capilaridad a través de la membrana gracias a la acción de la almohadilla absorbente situada en el extremo opuesto de la tira.

Por último, para llevar a cabo el registro de la señal, se empleó un escáner convencional de oficina. La medida de la intensidad RGB (*Red*, *Green*, *Blue*) de las líneas test y control de cada

tira inmunorreactiva se llevó a cabo empleando el programa ImageJ.²⁴² Tras el procesamiento de la señal, su representación frente a la concentración de OTA en escala logarítmica permitió obtener curvas de inhibición sigmoideas de cuatro parámetros similares a las descritas para los métodos ELISA, lo que hizo posible determinar el valor de IC₅₀ de cada combinación de inmunorreactivos en este formato de ensayo. Por otra parte, este tipo de ensayo puede dar lugar, básicamente, a dos curvas de inhibición en función de cómo se procesen los datos; la primera de estas curvas estaría basada en la variación de la LT y la segunda de ellas en la relación entre ambas líneas (LT/LC).

3.6.1 Selección de inmunorreactivos

El primer paso para el desarrollo de la tira inmunorreactiva fue la selección del anticuerpo y del conjugado competidor. Para ello, un grupo de anticuerpos (**b#310b**, **d#21**, **d#111**, **d#115**, **f#223** y **c#117**) se ensayaron con los conjugados de BSA de los haptenos con grupo funcional carboxilo (haptenos **b**, **d**, **e** y **f**).

En una primera aproximación, se evaluó de forma visual y semicuantitativa la señal máxima obtenida para cada pareja de inmunorreactivos, así como la inhibición en la línea test frente a concentraciones de OTA de 2 y 10 ng/mL. Para llevar a cabo este estudio preliminar, se fijó la concentración de conjugado de BSA en 200 ng por tira inmunorreactiva; en el caso de los conjugados NP@mAb, se empleó 1 µg de mAb por mililitro de NP (OD = 1). Los ensayos se llevaron a cabo mezclando 25 µL de disolución del conjugado NP@mAb y 75 µL de disolución de OTA en tampón de ensayo (Tris-HCl 100 mM, NaCl 30 mM, pH 8.0). A modo de ejemplo, en la Figura 3.12 se muestran los cuatro posibles patrones obtenidos de líneas test y control.

Patrones similares a A) o D) de la Figura 3.12 son los más deseables, ya que presentaban inhibición completa o casi completa de la LT a una concentración de 2 ng/mL de OTA. En el primero de ellos se muestra una desaparición completa de la LT a dicha concentración, una buena sensibilidad de partida para el desarrollo del inmunoensayo; en el caso del patrón D), además de inhibición de la señal de la LT, se observa la desaparición de la LC a medida que la concentración de OTA disminuye, lo que permite una doble identificación en función de la intensidad relativa de ambas líneas. Por otra parte, patrones del tipo B) o C) no permitirían el desarrollo de un inmunoensayo; el primero de ellos por no presentar una sensibilidad adecuada, y el segundo debido a que el conjugado de la LT no es reconocido por el anticuerpo.

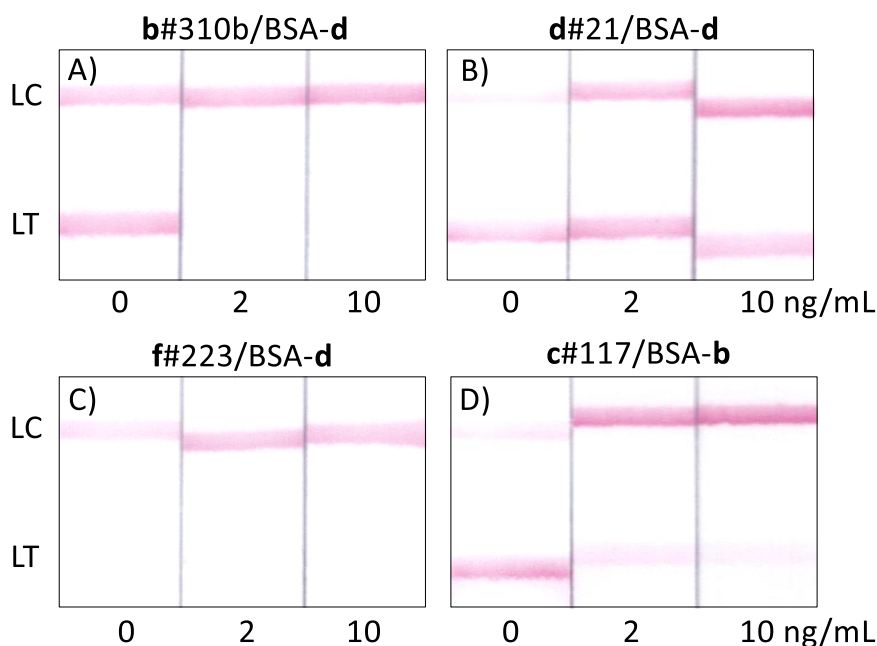


Figura 3.12. Ejemplo de los cuatro patrones de intensidad de la LT y LC obtenidos durante la preselección de inmunorreactivos para el desarrollo de la tira inmunorreactiva.

Teniendo en cuenta los resultados de esta primera evaluación, se seleccionaron los mAbs **b#310b** y **c#117** y los conjugados **BSA-b**, **BSA-d** y **BSA-e** para realizar curvas de inhibición completas que permitiesen determinar la IC_{50} del ensayo bajo las condiciones previamente descritas. El conjugado **BSA-f** se descartó debido a que no se obtuvo señal en ninguna de las combinaciones ensayadas, quizás debido de nuevo a la ausencia de brazo espaciador en la estructura del hapteno, tal y como ocurría con el trazador **HRP-f**. En la Tabla 3.17 se muestran los valores de IC_{50} de las curvas de inhibición basadas en la LT y en la relación LT/LC de las combinaciones de inmunorreactivos seleccionadas.

Tabla 3.17. Caracterización basada en tira inmunorreactiva de los anticuerpos monoclonales seleccionados empleando conjugados homólogos y heterólogos.^a

mAb	Curva	BSA-b		BSA-d		BSA-e	
		S_{max}^b	IC_{50}^c	S_{max}	IC_{50}	S_{max}	IC_{50}
b#310b	LC	13.0	-	11.8	-	12.7	-
	LT	29.3	0.16	11.8	0.09	11.7	0.08
	LT/LC ^d	3.4	0.12	1.0	0.09	0.9	0.08
c#117	LC	21.0	-	24.2	-	20.2	-
	LT	28.8	0.63	30.2	x ^e	3.2	0.11
	LT/LC	2.2	0.61	4.3	x	0.2	0.10

^a Los valores de IC_{50} y S_{max} son la media de tres determinaciones independientes. ^b Señal RGB máxima. La señal de la LT se obtuvo del punto en ausencia de OTA. La señal de la LC se obtuvo del punto con máxima concentración de OTA. ^c Concentración expresada en ng/mL. ^d Cociente entre la señal RGB de LT y LC en la tira inmunorreactiva en ausencia de OTA. ^e No se obtuvo inhibición a 10 ng/mL de OTA.

La selección de la combinación más adecuada se realizó atendiendo especialmente a la IC_{50} obtenida, tanto procesando solo la señal de la LT como la relación LT/LC. Valores similares de la IC_{50} en ambas curvas indican que la LC es independiente de la LT, es decir, la señal de la LC es constante para todas las concentraciones de OTA. Atendiendo a estos criterios, se decidió seleccionar dos ensayos, ambos basados en el mAb **b#310b**. El primero de ellos emplea como competidor el conjugado heterólogo BSA-**e**, y fue seleccionado debido a su sensibilidad en ambas curvas de inhibición. En cuanto al segundo, emplea el conjugado homólogo BSA-**b**, y la elección se basó en que tanto la señal de la LC como la de la LT variaban en función de la concentración de OTA, con el objetivo de evaluar las prestaciones analíticas de esta opción, a pesar de dar lugar a un ensayo con una sensibilidad ligeramente inferior.

El siguiente paso en el desarrollo de la tira inmunorreactiva fue la optimización de la sensibilidad y, especialmente, la señal máxima de ambos ensayos. Para ello, se evaluó la cantidad de mAb empleada en el ensayo mediante dos aproximaciones: la primera de ellas consistió en modificar la cantidad de anticuerpo inmovilizada sobre la NP, mientras que la segunda implicó el uso de diferentes volúmenes de conjugado NP@mAb. Las concentraciones de anticuerpo evaluadas fueron 1, 3 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que los volúmenes de conjugado NP@**b#310b** fueron 10 y 20 μL , completando hasta 100 μL con la disolución estándar de OTA (Figura 3.13).

La concentración de anticuerpo con la que se obtuvo mejores resultados para ambos ensayos fue de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cuanto al volumen de conjugado, en el caso del ensayo homólogo se decidió emplear 10 μL por presentar una mayor sensibilidad con una señal adecuada. En el caso del ensayo heterólogo, basado en el conjugado BSA-**e**, fueron varias las combinaciones interesantes en términos de sensibilidad. Se optó por emplear 20 μL a pesar de no ser las condiciones que proporcionaron una mayor inhibición debido a que la señal de la LT en ausencia de OTA era mayor, una importante ventaja ante posibles efectos matriz en el análisis de muestras de zumo o vino. Las características de las condiciones seleccionadas para ambos ensayos se muestran en la Tabla 3.18.

Si bien la caracterización se llevó a cabo mediante la obtención de curvas de inhibición, lo más habitual y deseable en este tipo de ensayos es emplear una única tira inmunorreactiva que proporcione información semicuantitativa sin necesidad de referencias externas o adicionales. En consecuencia, se optó por continuar trabajando de forma exclusiva con el ensayo NP@**b#310b**/BSA-**e** debido a que resultaba más fácil de interpretar visualmente, a pesar de mostrar una IC_{50} ligeramente superior, puesto que el resultado depende únicamente de la variación de la señal de una de las líneas.

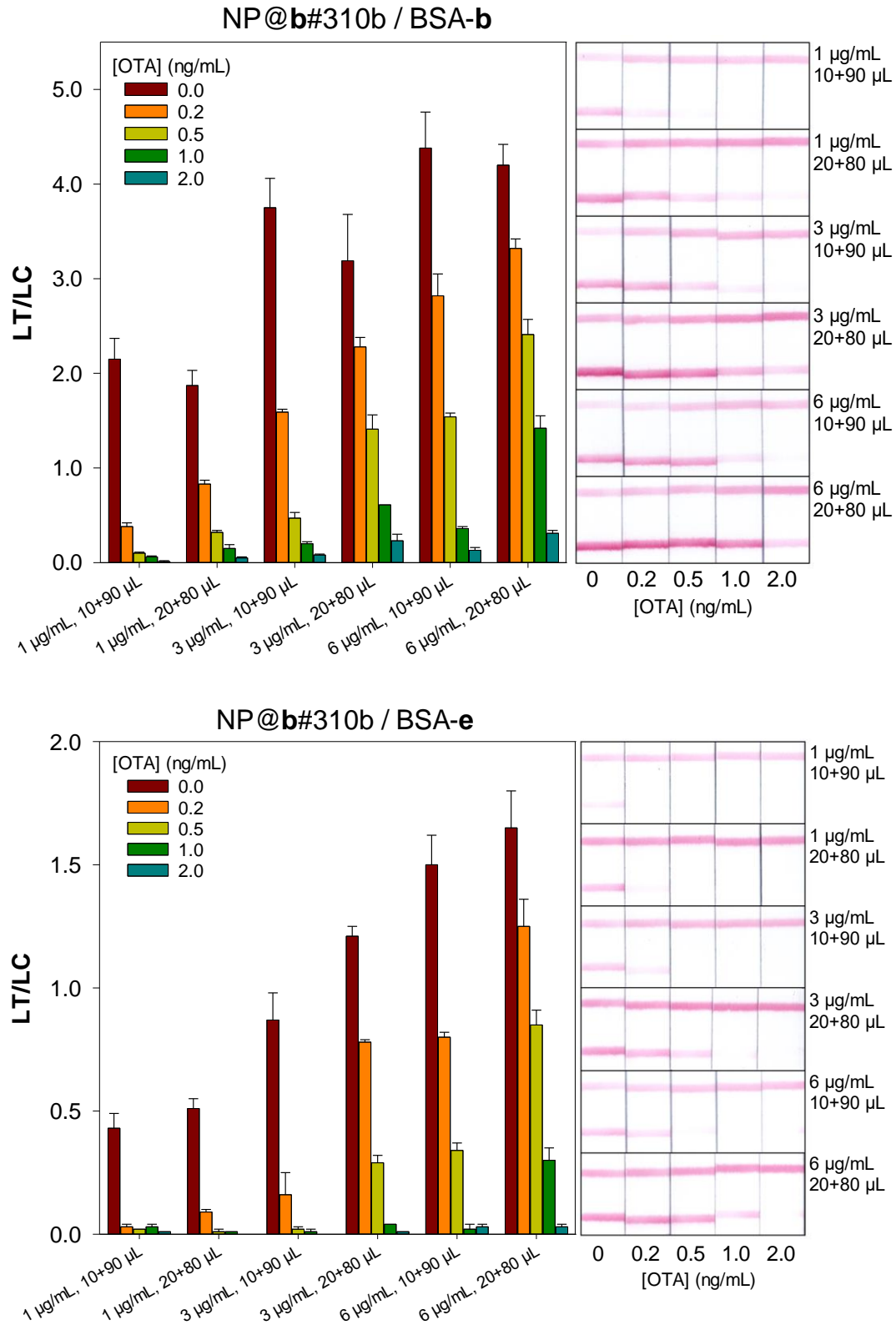
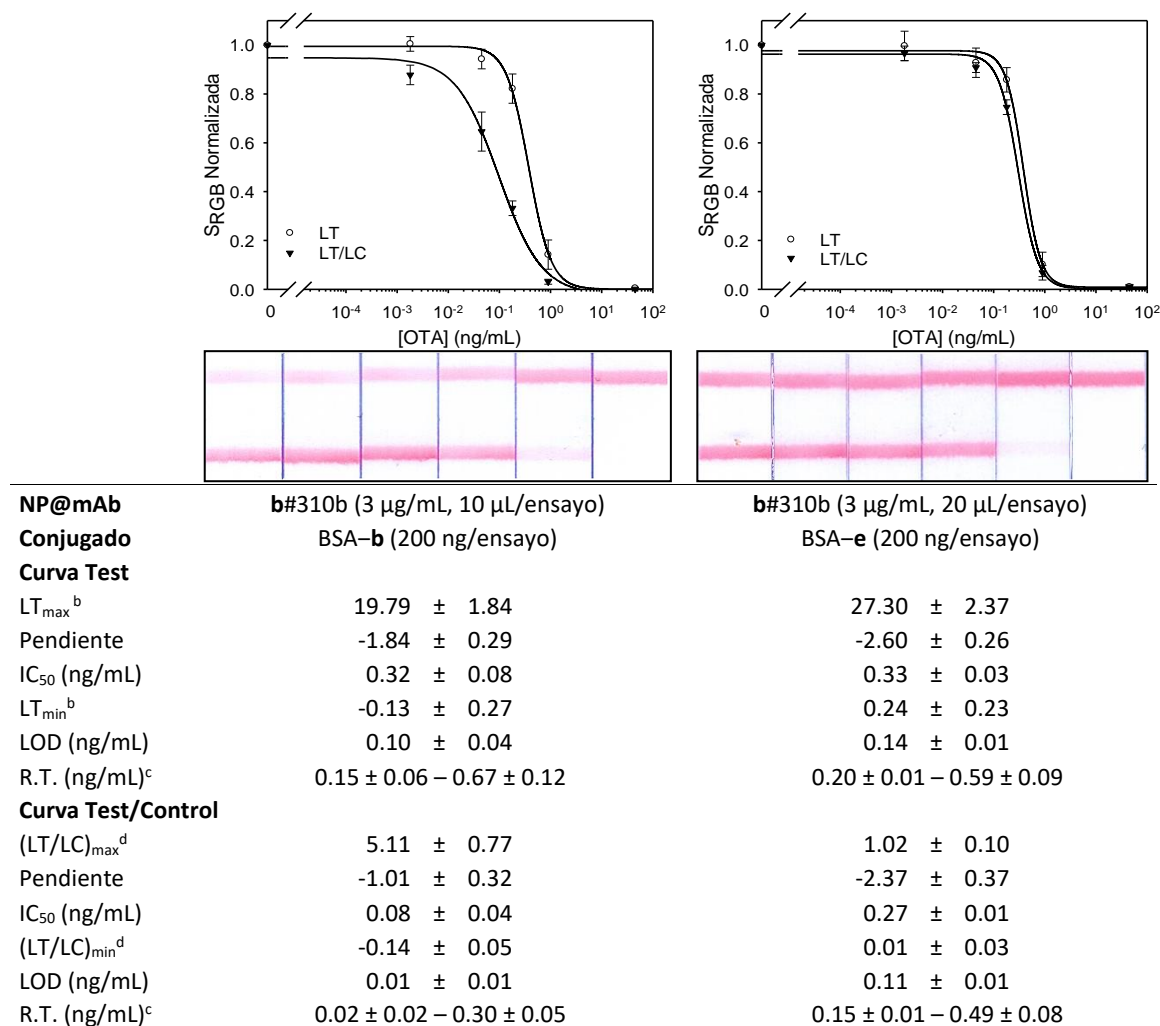


Figura 3.13. Optimización de la concentración de anticuerpo y volumen de conjugado NP@mAb basada en la relación LT/LC para los dos ensayos seleccionados. Los valores representados son la media de dos determinaciones independientes. Superior: ensayo NP@b#310b/BSA-b. Inferior: ensayo NP@b#310b/BSA-e.

Tabla 3.18. Características de los ensayos inmunocromatográficos seleccionados.^a



^a Los valores son la media de tres determinaciones independientes. ^b Señal de la LT antes de normalizar. ^c Rango de trabajo calculado como el intervalo IC₂₀-IC₈₀. ^d Relación LT/LC antes de normalizar.

3.6.1.1 Optimización del pH y de la fuerza iónica

Al igual que en el método ELISA, se realizó una breve evaluación del pH y la fuerza iónica del tampón de ensayo con el objetivo de optimizar sus valores y así conseguir un aumento de la sensibilidad. Los valores de pH y fuerza iónica evaluados estuvieron comprendidos entre 7.0 y 9.0 y entre 56 y 296 mM, respectivamente. Paralelamente, ya que se pretendía analizar muestras de vino, se realizó un estudio de tolerancia a etanol.

Los tampones estuvieron basados en Tris-HCl, empleando como referencia las condiciones del tampón Tris-HCl 100 mM, NaCl 30 mM (pH 8.0, *I* = 86 mM). Los ensayos competitivos se llevaron a cabo mezclando 80 µL de disolución estándar de OTA preparada en los distintos tampones con 20 µL de NP@b#310b en Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, con 0.5% (v/v) de Tween-20. En el caso del estudio de tolerancia de etanol, las disoluciones estándar se prepararon en el tampón de referencia con

distintas proporciones de este disolvente. Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 3.14.

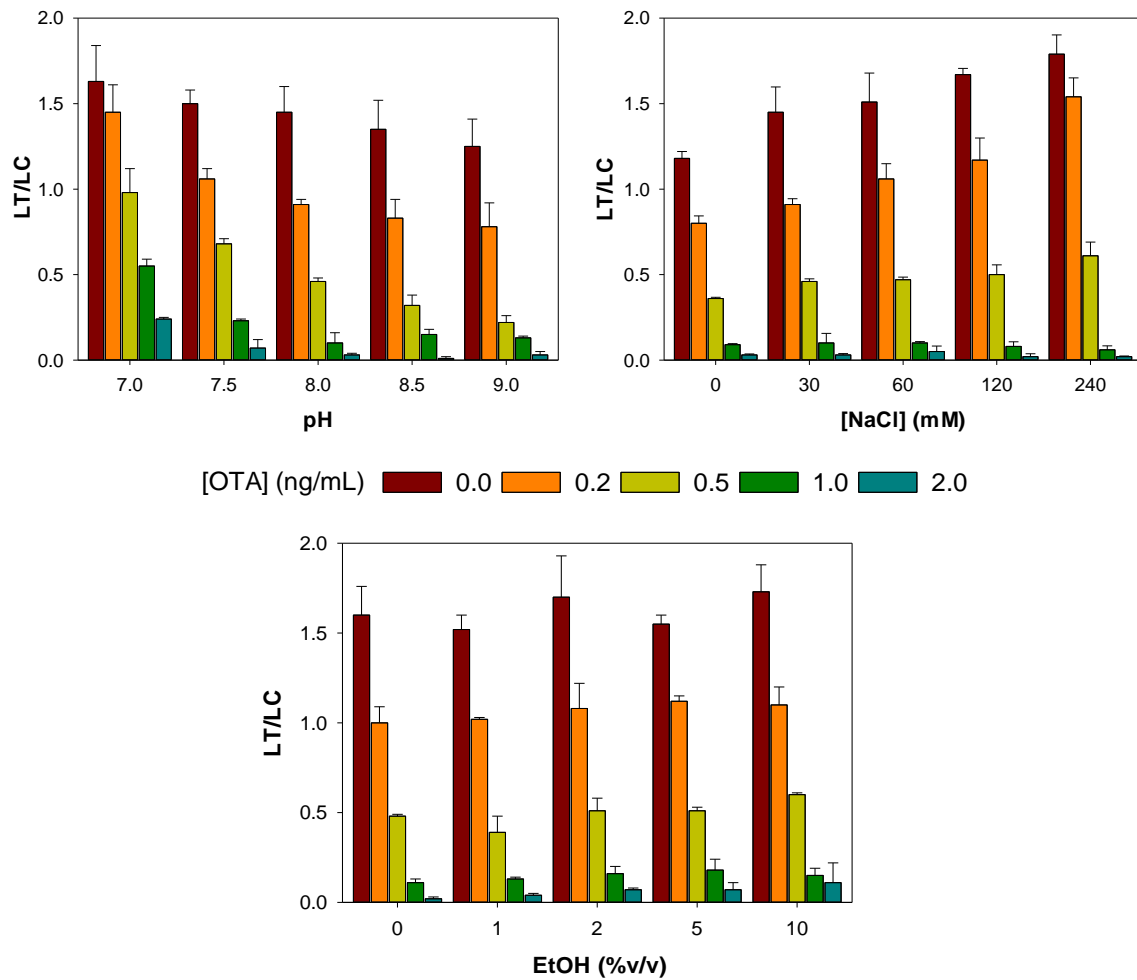


Figura 3.14. Superior: Influencia del pH y de la fuerza iónica sobre los valores de señal LT/LC y sobre la sensibilidad de la tira inmunorreactiva NP@b#310b/BSA-e. Inferior: tolerancia frente a EtOH de la tira inmunorreactiva. Los valores representados son la media de dos determinaciones independientes.

La tira inmunorreactiva desarrollada mostró una elevada robustez frente a los dos parámetros fisicoquímicos estudiados, así como a la presencia de EtOH. A valores de pH inferiores a 8.0 se produjo un ligero aumento de la señal acompañado de la pérdida de sensibilidad. Sin embargo, condiciones de pH superiores dieron lugar a resultados similares a las condiciones de referencia. En el caso de la fuerza iónica, valores más elevados de este parámetro dieron lugar a un aumento de señal acompañado de nuevo de una ligera pérdida de sensibilidad. Por otra parte, todas las concentraciones de EtOH evaluadas dieron lugar a ensayos con características de señal e inhibición casi idénticas a las del tampón de referencia.

Dado que ninguna de estas condiciones dio como resultado una mejora destacable de los parámetros analíticos obtenidos en el tampón de referencia, se decidió continuar trabajando con este como tampón de ensayo.

3.6.2 Análisis de muestras fortificadas

Una vez evaluados los parámetros fisicoquímicos del ensayo, se procedió a su aplicación a muestras dopadas con concentraciones conocidas de OTA (0.2, 0.5, 1, y 2 ng/mL). Teniendo en cuenta la sensibilidad del ensayo inmunocromatográfico seleccionado, el tratamiento de muestra descrito para el método ELISA (dilución 1/10 de la muestra en el tampón de ensayo y posterior tratamiento con PVPP) no permitía alcanzar los LOD deseados, obteniéndose una inhibición de la relación LT/LC de tan solo el 20% a una concentración de OTA de 2 ng/mL.

Ante la insuficiente sensibilidad de este procedimiento para un método cuya pretensión era poder identificar claramente de forma visual si una muestra era conforme o no según la legislación vigente, se decidió desarrollar un tratamiento de muestra alternativo que implicase una menor dilución y que a la vez redujese el efecto matriz. Para ello, se decidió aprovechar las propiedades ácido/base de OTA y llevar a cabo una extracción con disolvente orgánico en medio ácido, para posteriormente reextraer la toxina en medio acuoso ligeramente básico. Como medio de extracción orgánico se seleccionó CH_2Cl_2 acidificado con H_3PO_4 , y como medio de extracción acuoso se empleó tampón de ensayo (pH 8.0), lo que permitía el uso directo del extracto final en la tira inmunorreactiva. El procedimiento consistió en mezclar 900 μL de muestra, 900 μL de CH_2Cl_2 y 90 μL de H_3PO_4 6 M; posteriormente, 600 μL del extracto orgánico se extrajeron con 300 μL de tampón de ensayo. Mediante este proceso, la concentración de OTA en la disolución a ensayar es el doble de la inicialmente presente en la muestra dopada, siendo el único factor de dilución el aplicado durante el ensayo; es decir, la concentración de OTA en el vial de ensayo es 1.6 veces la original. Mediante este tratamiento, las cuatro matrices de interés mostraron inhibición completa al límite máximo establecido por la CE, tal y como se muestra en la Figura 3.15.

Mediante este nuevo tratamiento de muestra se consiguió una mejora muy considerable en la sensibilidad para las cuatro matrices de interés, llegándose a obtener un vLOD de entre 0.5 y 1 ng/mL en muestra y, lo que es más destacable, consiguiéndose que una muestra que contenga al menos 2 ng/mL dé lugar a una inhibición total de la señal en la LT. Aunque, como se aprecia en la Figura 3.15, la señal LT/LC en ausencia de OTA varía en función del tipo de muestra, en todas ellas concentraciones superiores a 1 ng/mL ocasionan la desaparición casi total de señal en la LT, un resultado muy prometedor para un método sencillo de cribado basado en la concentración máxima regulada en la UE para estos productos.

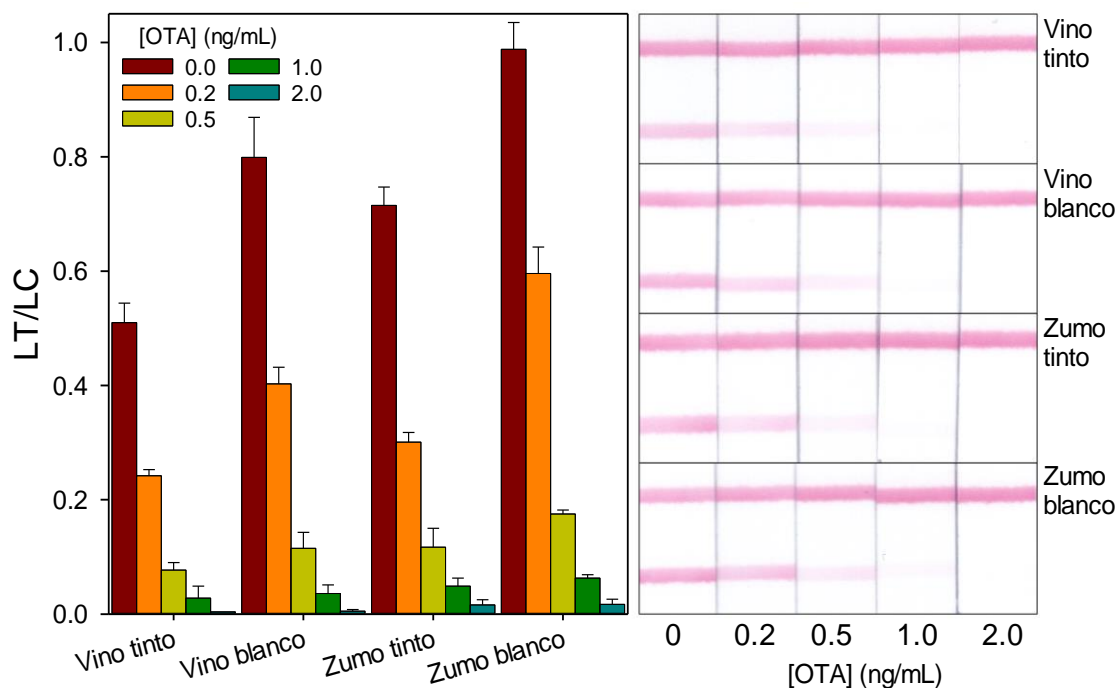


Figura 3.15. Inhibición de la relación LT/LC en las cuatro matrices de trabajo con distintas concentraciones de OTA. Los valores representados son la media de tres determinaciones independientes.

3.6.3 Validación de tiras inmunes: Regulación (UE) 519/2014

Debido a la creciente popularidad y aplicabilidad de los métodos de *screening*, la UE incorporó en el reglamento No 519/2014 la metodología específica para la validación de este tipo de técnicas en el ámbito de las micotoxinas.²⁴³ En consecuencia, se decidió llevar a cabo la validación de la tira inmune desarrollada según lo establecido en esta normativa.

El principal objetivo de este estudio es determinar el umbral de corte (valor de *cut-off*) de la relación LT/LC, es decir, el valor de LT/LC que permitirá distinguir entre muestras negativas y muestras sospechosas de contener OTA por encima de una concentración determinada de analito denominada concentración de cribado, o *STC* (*Screening Target Concentration*).^{244,245} Esta validación ha de llevarse a cabo estableciendo una tasa de falsos negativos del 5%. Además, se han de realizar un total de veinte medidas de cada matriz dopada a la *STC* de interés junto con veinte muestras sin dopar. En nuestro caso, el valor de *STC* se estableció en 2 ng/mL, incluyendo también en el estudio muestras dopadas a 1/4×*STC*, un objetivo mucho más exigente y que permite evaluar la capacidad del ensayo para distinguir entre concentraciones bajas de OTA y la propia *STC*. Las 20 determinaciones exigidas por la normativa se realizaron con 4 muestras diferentes de cada matriz que se analizaron durante 5 días consecutivos. El umbral de corte se calculó de acuerdo a la ecuación 3.1, donde R_{STC} representa la media de la señal de las muestras dopadas a la *STC*, $t_{value0.05}$

es el valor de t de una cola para un porcentaje de falsos negativos del 5%, y SD_{STC} es la desviación estándar a la STC.

$$Cut\ off = R_{STC} - t_{value0.05} \times SD_{STC} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Tal y como se observa en la Figura 3.16, se obtuvo una completa separación entre los valores de LT/LC obtenidos para muestras sin OTA (valores medios de LT/LC entre 0.68 y 0.83) y muestras dopadas a la STC (valores medios de LT/LC entre 0.01 y 0.02), e incluso a $1/4 \times STC$ (valores medios de LT/LC entre 0.11 y 0.18). Además, a pesar de que las señales para la STC y $1/4 \times STC$ se encuentran próximas, existe una total separación entre las mismas, demostrando la capacidad del método para distinguir entre estas dos concentraciones.

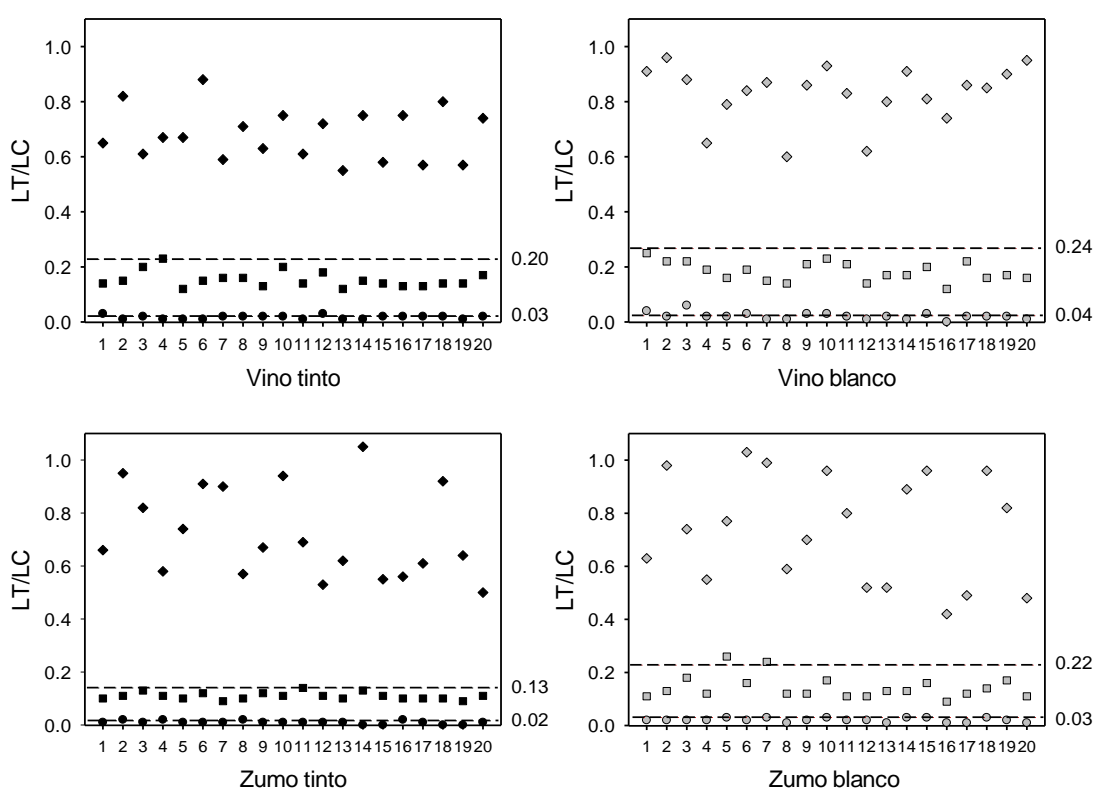


Figura 3.16. Valores de LT/LC y umbrales de corte (líneas horizontales) para las cuatro matrices sin dopar (rombos) y dopadas a 0.5 (cuadrados) y 2 ng/mL (círculos) con OTA en vinos y zumos.

Por otra parte, la tasa de falsos sospechosos representa la probabilidad de que una muestra con una concentración inferior al STC sea erróneamente clasificada como sospechosa de superar dicha STC. Para el cálculo de este parámetro es necesario la obtención previa de la t de una cola, que se obtiene empleando la ecuación 3.2, donde $media_{blanco}$ y SD_{blanco} representan el valor medio y desviación estándar de LT/LC, respectivamente, de las muestras sin dopar. Adicionalmente, también puede calcularse este parámetro para concentraciones inferiores a la STC

empleando sus respectivas media y desviación estándar. Los resultados obtenidos para las cuatro matrices se muestran en la Tabla 3.19.

$$t_{\text{value}} = (\text{media}_{\text{blanco}} - \text{cut-off}) / SD_{\text{blanco}} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Tabla 3.19. Resultados de la validación de la tira inmunorreactiva desarrollada de acuerdo a la Regulación de la Comisión (EU) 519/2014.

		Vino tinto		Vino blanco		
		Tasa falsos sospechosos (%)		Tasa falsos sospechosos (%)		
[OTA] ^a	S ^b ± sd	1/4 STC	STC	S ± sd	1/4 STC	STC
0.0	0.68 ± 0.09	4·10 ⁻³	<10 ⁻³	0.83 ± 0.10	1·10 ⁻³	<10 ⁻³
0.5	0.15 ± 0.03	-	0.02	0.18 ± 0.03	-	0.03
2.0	0.02 ± 0.01	-	-	0.02 ± 0.01	-	-
<i>Cut-off</i>		0.20	0.03		0.24	0.04

		Zumoo tinto		Zumoo blanco		
		Tasa falsos sospechosos (%)		Tasa falsos sospechosos (%)		
[OTA] ^a	S ± sd	1/4 STC	STC	S ± sd	1/4 STC	STC
0.0	0.72 ± 0.17	0.13	0.03	0.74 ± 0.20	0.97	0.13
0.5	0.11 ± 0.01	-	<10 ⁻³	0.14 ± 0.04	-	1.09
2.0	0.01 ± 0.01	-	-	0.02 ± 0.01	-	-
<i>Cut-off</i>		0.13	0.02		0.22	0.03

^a Concentraciones de dopaje expresada en ng/mL. ^b Relación LT/LC.

Dado que las cuatro matrices mostraron inhibición completa a la STC establecida, los umbrales de corte de todas ellas, asumiendo una tasa del 5% de falsos negativos, estuvieron comprendidos entre 0.02 y 0.04. Por su parte, la tasa de falsos sospechosos fue en todos los casos muy próxima a cero, siendo la del zumo blanco las más elevada con un 0.13%. Este resultado indica que tan solo 1.3 muestras de cada mil con un contenido de OTA inferior a la STC serían erróneamente calificadas con incumplir la legislación. En el caso de 1/4×STC, los umbrales de corte estuvieron comprendidos entre 0.13 y 0.24, siendo de nuevo la tasa de falsos sospechosos más elevada la del zumo blanco, con un 0.97%. Cuando se aplican criterios incluso más restrictivos, asumiendo una tasa de falsos negativos del 1%, los umbrales de corte de la STC pasaron a estar comprendidos entre 0.02 y 0.05, siendo la tasa de falsos sospechosos más elevada del 0.14%. Los umbrales de corte de 1/4×STC estuvieron entre 0.14 y 0.27, y la tasa de falsos sospechosos más elevada pasó a ser del 1.40%.

En definitiva, la tira inmurreactiva desarrollada cumple con creces los criterios de la regulación vigente aplicada a los métodos semicuantitativos de *screening*. Además, podemos concluir que si una muestra de cualquiera de las cuatro matrices, analizada siguiendo el procedimiento establecido, presenta un valor de LT/LC de 0.04 o inferior (umbral de cribado del zumo blanco a la STC), se puede afirmar que contiene OTA a una concentración igual o superior a

2 ng/mL con una probabilidad del 95%, o incluso del 99%. Estos resultados demuestran la validez de la tira inmunorreactiva desarrollada para detectar OTA de manera rápida, sencilla y semicuantitativa en muestras de vinos y zumos a los niveles que requiere la exigente legislación que rige en la UE.

3.6.3.1 Validación del método ELISA según la Regulación (UE) 519/2014

Dado que las directrices del reglamento (EU) No 519/2014 están diseñadas para métodos de *screening* semicuantitativos, se decidió adaptar el ELISA desarrollado para poder aplicar esta regulación. Para ello, se prescindió de la curva estándar típica de este tipo de métodos y se empleó únicamente un blanco de tampón a modo de referencia que se emplearía para normalizar la señal de las muestras ensayadas. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 3.17 y en la Tabla 3.20.

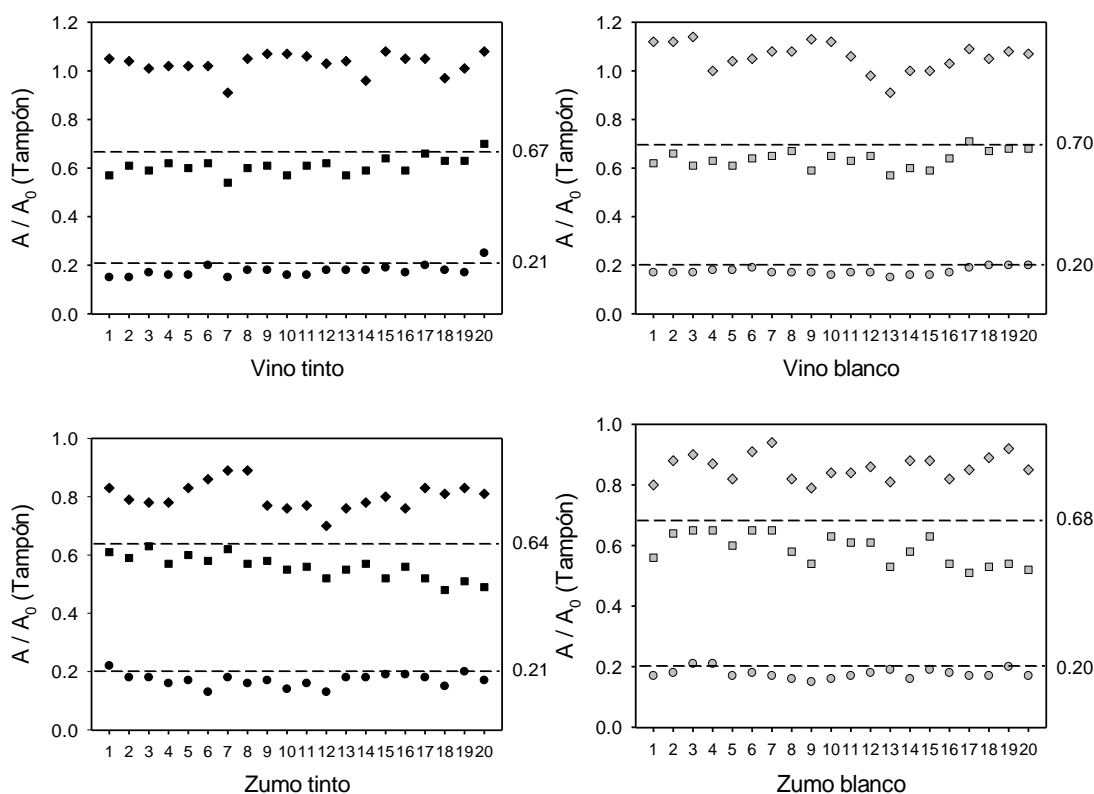


Figura 3.17. Valores de absorbancia (450 nm) normalizada y umbrales de corte (líneas horizontales) para las cuatro matrices sin dopar (rombos) y dopadas a 0.5 (cuadrados) y 2 ng/mL (círculos) con OTA en vinos y zumos.

Tal y como era de esperar, mediante esta adaptación semicuantitativa del ELISA se obtuvieron tasas de falsos sospechosos inferiores al 0.001% para las cuatro matrices, tanto para muestras sin dopar como para muestras dopadas a $1/4 \times \text{STC}$. En el caso de $1/4 \times \text{STC}$, la tasa de falsos sospechosos más elevada se obtuvo para el zumo tinto (0.20%), valor que indica que solo dos de cada mil muestras que contuviesen OTA por debajo de $1/4 \times \text{STC}$ serían erróneamente catalogadas

con superar dicha concentración. Cuando se realizan los cálculos asumiendo una tasa de falsos negativos del 1%, esta tasa asciende al 1.1%. Todos estos datos ponen de manifiesto que un ensayo de este tipo posee también una elevada capacidad de para distinguir las tres concentraciones empleadas en este estudio.

Tabla 3.20. Resultados de la validación del ELISA desarrollado de acuerdo a la Regulación de la Comisión (EU) 519/2014.

[OTA] ^a	Vino tinto			Vino blanco		
	A _{Norm} ^b ± sd	Tasa falsos sospechosos (%)		A _{Norm} ^b ± sd	Tasa falsos sospechosos (%)	
		1/4 STC	STC		1/4 STC	STC
0.0	1.03 ± 0.04	<10 ⁻³	<10 ⁻³	1.06 ± 0.06	<10 ⁻³	<10 ⁻³
0.5	0.61 ± 0.03	-	<10 ⁻³	0.64 ± 0.04	-	<10 ⁻³
2.0	0.18 ± 0.02	-	-	0.18 ± 0.01	-	-
<i>Cut-off</i>		0.67	0.21		0.70	0.20

[OTA] ^a	Zumoo tinto			Zumoo blanco		
	A _{Norm} ^b ± sd	Tasa falsos sospechosos (%)		A _{Norm} ^b ± sd	Tasa falsos sospechosos (%)	
		1/4 STC	STC		1/4 STC	STC
0.0	0.80 ± 0.05	0.20	<10 ⁻³	0.86 ± 0.04	0.02	<10 ⁻³
0.5	0.56 ± 0.05	-	<10 ⁻³	0.58 ± 0.06	-	<10 ⁻³
2.0	0.17 ± 0.02	-	-	0.18 ± 0.02	-	-
<i>Cut-off</i>		0.64	0.21		0.68	0.20

^a Concentraciones de dopaje expresada en ng/mL. ^b Señal normalizada con respecto al tampón.

3.7 EVALUACIÓN DE KITS ELISA Y LFIA COMERCIALES

Llegados a este punto, decidimos evaluar las prestaciones de algunos de los kits comercialmente disponibles para la cuantificación de OTA en vino. De todos los kits descritos en la Tabla 1.4, se seleccionaron tres kits ELISA y un kit de tiras inmunorreactivas. En el caso de los ELISA, se seleccionaron aquellos que, de acuerdo con las especificaciones proporcionadas por el fabricante, permitían determinar una concentración de 2 ng/mL de esta micotoxina en vino. En el caso de las tiras inmunorreactivas, la oferta de kits diseñados para su aplicación en muestras de vino era considerablemente menor, por lo que seleccionamos únicamente el kit con menor LOQ.

Para llevar a cabo la evaluación de estos kits se realizó un estudio de recuperaciones similar al descrito previamente para el ensayo desarrollado durante la Tesis: muestras de vino, tanto tintos como blancos, fueron dopadas con OTA a las concentraciones de interés y posteriormente tratadas y analizadas de acuerdo al manual de cada kit (especificaciones en anexo E y protocolo en la sección 5.11).

3.7.1 Evaluación de kits ELISA

Los tres kits seleccionados fueron los comercializados por Abraxis Eurofins, EuroProxima y BiooScientific, todos ellos aplicables a diversas matrices entre las que específicamente se incluye el vino. Los LOD para esta toxina en vino según los manuales de usuario son 1.75, 0.3 y 0.15 ng/mL, respectivamente, por lo que en una primera evaluación se seleccionó un vino tinto y un vino blanco y fueron dopados con OTA a concentraciones de 0.5 y 2 ng/mL. Los valores de concentración obtenidos se muestran en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Concentraciones obtenidas en muestras dopadas de vino tinto y vino blanco empleando los kits ELISA comerciales seleccionados.^a

Tipo de muestra	[OTA] ^b	Abraxis	BiooScientific	EuroProxima	f#223/HRP-b
		[OTA] ^c	[OTA] ^c	[OTA] ^c	[OTA] ^c
Tinto	0.5	1.5	0.7	0.7	0.6
	2	2.7	1.1	1.6	1.9
Blanco	0.5	0.9	0.3	0.4	0.5
	2	1.8	1.5	1.5	2.0

^a Los valores corresponden a una única medida. ^b Concentración de fortificación de OTA expresada en ng/mL. ^c Concentración de OTA hallada expresada en ng/mL.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los tres kits son capaces de cuantificar 2 ng/mL de OTA con mayor o menor exactitud (valores de concentración entre 1.1 y 2.7 ng/mL). Sin embargo, únicamente los kits de BiooScientific y Europroxima fueron capaces de proporcionar resultados aceptables para muestras dopadas a 0.5 ng/mL. En el caso del kit de Abraxis, se produce una evidente sobreestimación a esta concentración de fortificación, sobre todo en vino tinto, resultado que está de acuerdo con el límite de detección establecido por el fabricante.

Una segunda evaluación de los kits de BiooScientific y Europroxima, en la que además se incluyeron muestras de vino sin dopar, mostró que ambos kits tienden a sobreestimar la concentración de OTA en estas muestras, en especial en el vino tinto, aunque luego los resultados con las muestras dopadas fueron razonablemente buenos (Tabla 3.22).

Teniendo en cuenta estos resultados, y dado que los límites de detección declarados por ambos kits eran inferiores a la concentración de dopaje más alta ensayada hasta el momento, se decidió evaluar concentraciones inferiores. Desafortunadamente, este estudio no fue posible con el kit de BiooScientific, ya que había dejado de comercializarse, situación que todavía hoy se mantiene. En cuanto al kit comercializado por Europroxima, se evaluaron concentraciones de 0.1 y 0.3 ng/mL, obteniéndose recuperaciones adecuadas únicamente al nivel de 0.3 ng/mL, tal y como indicaba el manual de dicho kit.

Tabla 3.22. Concentraciones obtenidas en muestras dopadas de vino tinto y vino blanco empleando los kit ELISA de BioScientific y de Europroxima.^a

Tipo muestra	[OTA] ^b	BioScientific		Europroxima		f#223/HRP-b	
		Vino 1	Vino 2	Vino 1	Vino 2	Vino 1	Vino 2
		[OTA] ^c	[OTA] ^c	[OTA] ^c	[OTA] ^c	[OTA] ^c	[OTA] ^c
Tinto	0	0.5	0.6	0.2	0.5	0.1	- ^d
	0.5	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.4
	1	1.1	1.1	0.8	0.9	1.2	0.8
	2	1.6	2.6	1.6	1.6	1.9	1.8
Blanco	0	0.2	0.2	-	-	-	0.1
	0.5	0.2	0.6	0.4	0.5	0.4	0.6
	1	0.8	1.1	0.6	0.8	1.0	1.1
	2	1.8	2.8	1.5	1.4	1.9	2.1

^a Los valores corresponden a una única medida. ^b Concentración de fortificación de OTA expresada en ng/mL. ^c Concentración de OTA hallada expresada en ng/mL. ^d Concentración inferior al LOD.

Por todo lo anterior, se puede concluir que el ensayo directo desarrollado durante esta Tesis, basado en los inmunorreactivos f#223/HRP-b, se encuentra, cuanto menos, al nivel en términos de detectabilidad, de los mejores kits ELISA comerciales disponibles actualmente para el análisis de OTA en vino. Además, el procesado de las muestras basado en dilución y tratamiento con PVPP es realmente sencillo.

3.7.2 Evaluación de tiras inmunorreactivas

Como ya se ha dicho, la oferta comercial de este tipo de inmunoensayos capaces de detectar OTA en vino al nivel regulado por la UE es mucho más reducida que en el caso de los kits ELISA, motivo por el cual se seleccionó únicamente el comercializado por Charm Sciences. Este inmunoensayo tiene un límite de detección declarado de 1 ng/mL, y está basado en un patrón de tres líneas, dos LT y una LC. Además, para el procesamiento de la señal se hace necesario el uso de un lector de tiras inmunorreactivas disponible a través de la misma casa comercial y que lleva implementado un software específico para el procesamiento de las señales y la emisión de los resultados. Por otra parte, al contrario que las tiras inmunorreactivas desarrolladas durante esta Tesis, este kit presenta almohadilla de conjugado, siendo únicamente necesario añadir una dilución de la muestra en el lugar dispuesto para tal fin. Previamente al análisis de cada conjunto de muestras, es necesario calibrar el lector con un patrón de color, así como analizar dos muestras (un control positivo y un control negativo) incluidas en el propio kit.

Como primera aproximación para la evaluación de este kit, se doparon muestras de vino tinto y blanco a niveles de 0, 1 y 2 ng/mL. Estas muestras fueron procesadas de acuerdo al manual de usuario incluido en el kit y analizadas empleando una tira inmunorreactiva para cada una de

ellas. En la Tabla 3.23 se muestran los valores de concentración obtenidos para este conjunto de muestras empleando el lector proporcionado.

Tabla 3.23. Concentraciones estimadas de las muestras dopadas mediante el kit LFIA de Charm Sciences.^a

[OTA] ^b	Vino Tinto	Vino Blanco
	[OTA] ^c	[OTA] ^c
0	0	0
1	1.2	0
2	1.8	1.5

^a Los valores corresponden a una única medida. ^b Concentración de fortificación de OTA expresada en ng/mL. ^c Concentración de OTA hallada en la muestra dopada expresada en ng/mL.

Esta primera evaluación demostró la capacidad del kit para determinar la presencia de OTA en vino al límite máximo establecido por la UE (2 ng/mL). Sin embargo, cuando la concentración de fortificación se redujo a 1 ng/mL, solo en el caso del vino tinto se obtuvo un valor adecuado. Los resultados obtenidos a 1 ng/mL motivaron una segunda evaluación de 3 muestras de vino tinto y 3 muestras de vino blanco dopadas a este nivel, obteniéndose 0.8, 0.4 y 0.2 ng/mL para vino tinto y 1.8, 0.5 y 0.5 ng/mL para vino blanco. Estos valores indican que, a pesar de lo especificado en el manual de usuario, el kit no parece capaz de proporcionar resultados fiables en muestras con una concentración de OTA de 1 ng/mL.

Por último, con el objetivo de determinar el vLOD en vino tinto, sin la utilización del lector suministrado, se analizaron muestras con concentraciones de OTA crecientes, obteniéndose las tiras mostradas en la Figura 3.18. Como se puede observar, el patrón de tres líneas en el que se basa este inmunoensayo permite establecer un límite de detección visual en vino tinto próximo a 5 ng/mL.

En definitiva, si bien el diseño del inmunoensayo de flujo lateral producido por Charm Sciences es ciertamente atractivo, y no requiere más procesamiento de la muestra que una simple dilución, su fiabilidad es menor de la esperada y depende en gran medida del software implementado en el lector, siendo su límite de detección visual considerablemente peor que el de la tira inmunorreactiva desarrollada en esta Tesis Doctoral.

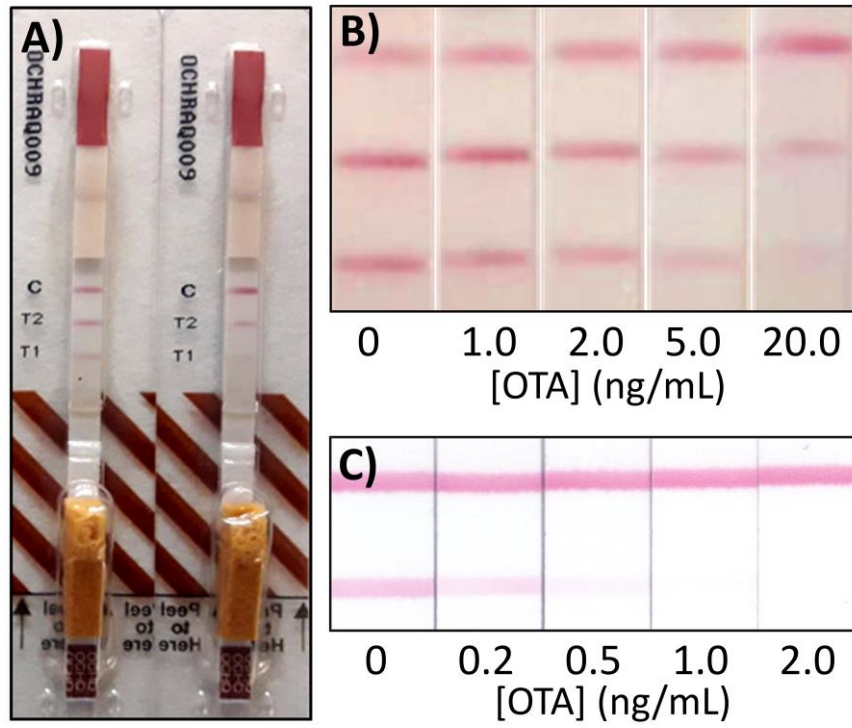
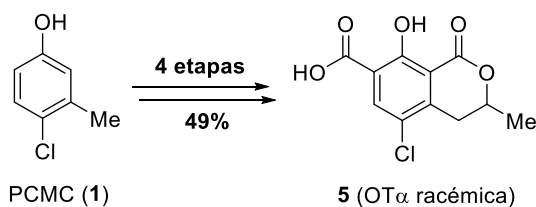


Figura 3.18. A) LFIA comercializado por Charm Sciences B) vLOD en vino tinto del ensayo comercializado por Charm Sciences C) vLOD en vino tinto de las tiras inmunorreactivas desarrolladas durante la Tesis.

4. CONCLUSIONES

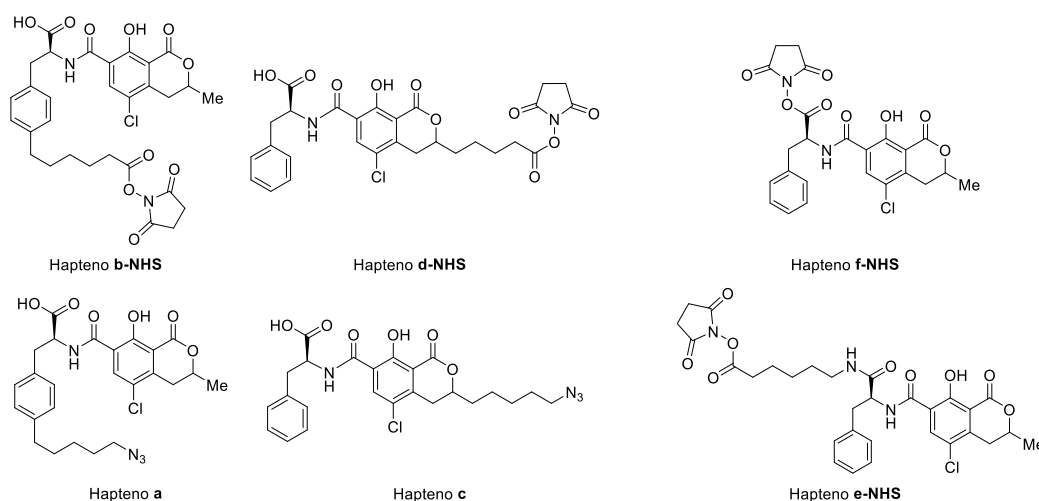
De acuerdo con los resultados expuestos en esta memoria, podemos concluir que se ha alcanzado con éxito el principal objetivo de esta Tesis Doctoral: la generación de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia ocratoxina A a partir de conjugados preparados a través de posiciones alternativas a la aproximación clásica que emplea el grupo carboxilo nativo de esta micotoxina. Además, con los anticuerpos obtenidos se ha desarrollado un ELISA y una tira inmunorreactiva que permiten la detección de ocratoxina A en matrices complejas, como vino y zumo de uva, con elevada precisión y exactitud. Las conclusiones particulares que pueden extraerse son las siguientes:

- Se ha desarrollado una nueva ruta sintética para la preparación del metabolito OT α . Esta nueva síntesis consta de 4 etapas empleando como sustrato de partida PCMC, y tiene un rendimiento global del 49%, rendimiento superior a los descritos previamente por otros autores.



- Se han sintetizado cuatro nuevos haptenos de OTA (haptenos **b**, **d**, **a** y **c**) en los que el grupo carboxilo nativo de la micotoxina se ha mantenido libre. Además, se han preparado dos haptenos que fueron conjugados a través de dicho grupo carboxilo como control (haptenos **e** y **f**). Los haptenos **b**, **d**, **e** y **f** se conjugaron a proteínas a través de la formación de un enlace

amida, mientras que los haptenos **a** y **c** se acoplaron a través de una reacción de CuAAC tras la modificación de las proteínas con grupos alquino.



- Mediante la inmunización de conejos con conjugados de los haptenos **b**, **d**, **e** y **f**, se ha demostrado la importancia del grupo carboxilo de OTA sobre la respuesta inmune hacia este analito. Así, los antiseros obtenidos a partir de los haptenos **b** y **d**, en los que se mantuvo el grupo carboxilo libre, mostraron afinidades superiores hacia OTA que los antiseros obtenidos a partir de los haptenos **e** y **f**.
- Se han obtenido anticuerpos de elevada afinidad hacia OTA mediante el uso de conjugados preparados a través de una reacción CuAAC (haptenos **a** y **c**), confirmándose la utilidad de esta estrategia de conjugación para analitos de pequeño tamaño. Nuestros resultados indican que la presencia del anillo de triazol en el brazo espaciador producto de este tipo de acoplamiento no supone un obstáculo a la hora de generar anticuerpos para OTA.
- Se ha obtenido un total de 22 anticuerpos monoclonales a partir de los seis haptenos sintetizados. Estos anticuerpos han sido evaluados en términos de afinidad y selectividad hacia OTA, y las mejores combinaciones de inmunorreactivos se han empleado para el desarrollo de un ELISA y de una tira inmunorreactiva.
- El ELISA directo desarrollado, basado en el mAb **f#223** en combinación con el trazador enzimático heterólogo HRP-**b**, se ha aplicado a muestras de vino y zumo de uva con excelentes resultados en términos de exactitud y precisión. El LOQ de este ensayo se situó en 0.5 ng/mL para vino y en 1 ng/mL para zumo, valores inferiores al límite establecido por la UE para este tipo de matrices (2 ng/mL).
- Se ha desarrollado una tira inmunorreactiva basada en el mAb **b#310b** en combinación con el conjugado heterólogo BSA-**e**. Este ensayo presentó un vLOD de 0.5 ng/mL en muestras de vino y zumo de uva. Además, el inmunoensayo fue validado de acuerdo a las directrices del

Reglamento 519/2014 de la UE, obteniéndose una muy baja tasa de falsos sospechosos para la STC seleccionada (2 ng/mL), demostrando así su utilidad como método rápido de cribado.

- Las prestaciones analíticas de los inmunoensayos desarrollados se han comparado con las exhibidas por kits comerciales. Este estudio ha permitido comprobar que el método basado en la técnica ELISA presentado en esta Tesis es capaz de competir en sensibilidad y fiabilidad con dichos kits, mientras que en el caso de la tira inmunorreactiva sus prestaciones fueron incluso superiores a las del mejor ensayo de este tipo disponible comercialmente.

CONCLUSIONS

According to the results exposed in the previous sections, the main objective of this Thesis was successfully accomplished: high-affinity antibodies against ochratoxin A have been generated using conjugates prepared through alternative approaches to the classical strategy, which implies the native carboxylic group of this mycotoxin. Moreover, an ELISA and an immunostrip have been developed for ochratoxin A detection in complex matrixes (wine and grape juice) with high precision and accuracy. The particular conclusions that can be drawn from this work are:

- A new route for the preparation of the OTA metabolite OT α has been developed. This new synthesis allows obtaining racemic OT α from PCMC after four steps with a total yield of 49%, a yield higher than that of previously reported approaches.
- Four new OTA haptens (**b**, **d**, **a**, and **c**) have been synthesised keeping unmodified the native carboxylic group of OTA. Additionally, two haptens (**e** and **f**) have been prepared as control using that native group for the conjugation. Haptens **b**, **d**, **e**, and **f** were directly conjugated to proteins by an amide bond, while haptens **a** and **c** were coupled to alkyne-modified proteins by a CuAAC reaction.
- The importance of the natural carboxylic group of OTA over the immune response was confirmed by the evaluation of rabbit polyclonal antibodies raised using haptens **b**, **d**, **e**, and **f**. The affinity towards OTA of antisera obtained from haptens **b** and **d**, with the free carboxylic group, was higher than the affinity of the antisera raised by haptens **e** or **f**.
- High affinity antibodies have been produced using CuAAC conjugates (haptens **a** and **c**), confirming the feasibility of this approach for small analytes such as OTA. The results indicate

that the triazole ring in the spacer arm does not preclude the production of high affinity antibodies towards this mycotoxin.

- A set of 22 monoclonal antibodies has been obtained from the 6 synthesised haptens. These monoclonal antibodies have been characterised in terms of affinity and specificity by competitive direct and indirect ELISA. The best combinations of immunoreagents have been selected for the development of an ELISA and an immunochromatographic strip.
- A direct ELISA based on the mAb **f#223** and the enzyme tracer HRP-**b** has been developed. When this assay was applied to fortified wine and grape juice samples, excellent recoveries and low standard deviations were obtained; the LOQ of the immunoassay was 0.5 ng/mL for wine samples and 1 ng/mL for juice samples, values below the legal limit set in these matrices by the European Commission (2 ng/mL).
- An immunostrip based on the mAb **b#310b** and the coating conjugate BSA-**e** has been developed. This assay showed a vLOD of 0.5 ng/mL in grape juice and wine samples. Moreover, the assay was validated according to the European Commission Regulation 519/2014, and a low false suspect rate for the selected STC (2 ng/mL) was obtained, thus proving the suitability of the method for screening purposes.
- The analytical performance of the developed immunoassays has been compared with that of commercial ELISA and LFIA kits. Whereas the ELISA method developed in this thesis is at the same level in terms of sensibility and reliability than the commercial kits evaluated, the developed immunostrip proved to be superior to the best commercial LFIA, showing a ten times lower vLOD.

5. EXPERIMENTAL PROCEDURES

5.1 Reagents, instruments and techniques

5.1.1 Hapten synthesis

Organic solvents were dried and distilled using standard techniques.²⁴⁶ Et₂O and THF were distilled over Na and benzophenone under N₂ atmosphere just before being used. CH₂Cl₂ and CH₃CN were distilled from CaH₂ in the same way. MeOH was dried and stored on activated molecular sieves (3Å). The remaining solvents and commercial reagents were used without prior purification. The operations with air and/or moisture-sensitive reagents were carried out under an inert atmosphere of dry N₂ or Ar, using syringes and/or cannulas, oven-dried (130 °C) glass material and freshly distilled and dried solvents. Deuterated solvents for NMR experiments were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid) and used without further purification. Reactions under high H₂ or CO pressure were performed in a TinyClave reactor from Büchi Labortechnik (Flawil, Switzerland). Microwave assisted reactions were carried out in a Discover SP reactor from CEM (Matthews, NC, USA). Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on precoated silica plates (0.25 mm layer thickness, Silica Gel 60 F₂₅₄) using UV light as the visualizing agent and ethanolic phosphomolybdic acid or aqueous ceric ammonium molybdate solutions and heat as developing agents. The synthesised compounds, excluding those showing a purity above 95% by NMR, were purified by flash column chromatography using silica gel 60 (particle size 0.043-0.063 mm). Melting points were determined on a Büchi M-560 apparatus and are uncorrected. Proton and carbon nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR) spectra were recorded at rt on a Bruker Avance

DPX300 spectrometer operating at 300.1 and 75.5 MHz, respectively, or on a Bruker Avance DRX500 spectrometer operating at 500.1 and 125.8 MHz, respectively. Chemical shifts (δ) are expressed in ppm recorded using the residual solvent as the internal reference in all cases [7.27/77.0 ppm, 2.50/39.5 and 3.31/49.1 for the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ spectra in CDCl_3 , DMSO and MeOH, respectively (ACD/NMR Processor Academic Edition spectra processing program, version 12.0)]. Carbon substitution degrees were established by DEPT pulse sequences. A combination of COSY and HSQC experiments was used in most cases for the assignment of ^1H and ^{13}C chemical shifts. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray ionization (ESI) mode in a TripleTOF™ 5600 LC/MS/MS System (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) mass spectrometer equipped with an electrospray source (Waters, Manchester, United Kingdom). The obtained data are expressed as mass/charge ratio (m/z).

5.1.2 Buffers and solutions

Aqueous solutions and buffers were prepared using ultrapure MilliQ® water generated in a Merck-Millipore system (Billerica, MA, USA). Salts and reagents were employed as purchased without purification.

- Coating buffer: 50 mM $\text{Na}_2\text{HCO}_3/\text{NaH}_2\text{CO}_3$ buffer, pH 9.6.
- Washing solution: 150 mM NaCl and 0.05% (v/v) Tween-20.
- PBS: 11 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer, 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4.
- PBS-T: PBS with 0.05% (v/v) Tween-20.
- PB: 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer, pH 7.4.
- PB75: 75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer, pH 7.4.
- PB75-T: 75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer with 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4.
- PBS-BSA-thimerosal: 1% (m/v) BSA and 0.01% (m/v) thimerosal in PBS.
- Substrate buffer: 25 mM citric acid and 62 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer, pH 5.4.
- Substrate solution: 2 mg/mL OPD and 0.012% (v/v) H_2O_2 in substrate buffer.
- Stop solution: H_2SO_4 1 M.
- SAS: saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
- Tris10: 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4.
- Tris100: 100 mM Tris-HCl buffer and 30 mM NaCl, pH 8.0.

5.1.3 Conjugates preparation

Bovine serum albumin (BSA, fraction V, Roche, cat. no. 10735094001, MW 66.0 kDa) and ovalbumin (OVA, V grade, cat. no. A2512, Mw 44.3 kDa) were purchased from Sigma-Aldrich, while horseradish peroxidase (HRP, cat. no. 31490, Mw 44.0 kDa, activity: 307 U/mg) was from

ThermoFisher Scientific (Madrid). Conjugates were prepared according to procedures described in the following sections and purified by size-exclusion chromatography in an ÄKTA Purifier system with UV detector using 5-mL Sephadex G-25 HiTrap Desalting columns from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Three columns were employed to purify BSA and OVA conjugates, and two columns to purify HRP conjugates, using PB buffer as eluent in all cases. Dialysis was carried out in 300 μ L Slide-a-Lyzer dialysis cassettes with 30 kDa membranes from Fisher Scientific. Analysis of hapten bioconjugates was performed by mass spectrometry in a 5800 MALDI TOF-TOF from ABSciex (Framingham, MA, USA) in positive linear mode (1500 shots for each position) in a mass range of 10000-120000 m/z . Matrix for MALDI-TOF analysis consisted of a solution containing sinapinic acid (5 mg/mL) and 2,2,2-trifluoroacetic acid (0,1% v/v) in CH₃CN/H₂O (7:3 (v/v)) from (Bruker, Billerica, MA, USA).

5.1.4 Antibody production and cell culture

Animals were obtained from Granja San Bernardo (Navarra). Female New Zealand rabbits [CrI:KBL(NWZ)] and female BALB/c mice (BALB/cAnNCrI) were held in the Animal Production section from the Central Support Service for Experimental Research (SCSIE) (University of Valencia) during the whole immunization process. Animal manipulation was performed in compliance with the European Directive 2010/63/EU²⁴⁷ and the Spanish laws and guidelines (RD1201/2005 and 32/2007)^{248,249} concerning the protection of animals used for scientific purposes. Sterile plastic was employed during the whole immunization and cell culture process.

Mouse plasmacytoma cell line P3-X63-Ag 8.653 from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, United Kingdom) was purchased from Sigma. Cell cultures were kept in a ThermoElectron incubator (Waltham, MA, USA) at 37 °C under 90% humidity and 5% CO₂ conditions. Cell counting was carried out using a Neubauer hemocytometer. Sterile meshes (EASYstrainer™, 70 μ m) for culture medium filtration were purchased from Greiner Bio-One (Kremsmunster, Austria) and Nunc® Cryotubes for cell lines conservation in liquid N₂ were purchased from Sigma-Aldrich.

Complete and incomplete Freund adjuvants, Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, high glucose content, cat. no. D6546), fetal bovine serum (FBS, cat. no. F7524), L-alanine-L-glutamine solution (L-Ala-L-Gln, 200 mM), non-essential amino acids (NEAA, 100 \times), Hybri-Max erythrocytes lysis buffer and polyethylene glycol (PEG 1500, cat. no. P7181) were purchased from Sigma-Aldrich. Gentamicin (50 mg/mL, cat. no. G1397), HT supplement (hypoxanthine 5 mM, thymidine 0.8 mM, cat. no. 41065-012) and HAT supplement (HT supplemented with aminopterin 20 μ M, cat. no. 21060-017) were obtained from Gibco BRL

(Paisley, United Kingdom). Hybridoma fusion and cloning supplement (HFCS, 50×, Roche, cat. no. 11363735001) and DMSO Hybri-Max (cat. no. D2650) were purchased from Sigma. All media and supplements were purchased in sterile conditions. The following culture media were prepared from the commercial media and supplements:

- Incomplete medium: DMEM with 2 mM *L*-Ala-*L*-Gln, 25 µg/mL NEAA and 25 µg/mL gentamicin.
- Complete medium: Incomplete medium with 10% FBS (v/v).
- Post-fusion medium: Incomplete medium with 15% FBS (v/v).
- HT-HFCS medium: Incomplete medium with 20% FBS (v/v), 100 µM hypoxanthine, 16 µM thymidine and 1% HFCS (v/v).
- HAT medium: HT-HFCS medium with 0.4 µM aminopterin.
- Cryopreservation medium: FBS with 10% DMSO (v/v).

Monoclonal antibodies were purified from late stationary phase hybridoma cell cultures by affinity chromatography using a 5-mL HiTrap Protein G HP column and a 5-mL Sephadex G-25 HiTrap Desalting column, both of them from GE Healthcare (Uppsala, Sweden), and stored at 4 °C as ammonium sulphate precipitates. Centrifugation-filtration of the purified monoclonal antibodies was performed in Amicon Ultra-4 tubes from Merck-Millipore (Billerica, MA, USA) with 30 kDa cellulose membranes.

Heavy chains mouse monoclonal antibody isotyping was performed using Calbiochem Hybridoma Subisotyping Kit from Merck-Millipore (cat. no. 386445). Rabbit anti-mouse immunoglobulins from Rockland Immunochemicals Inc (Limerick, PA, USA) were employed for light chains isotyping.

5.1.5 Immunoassays

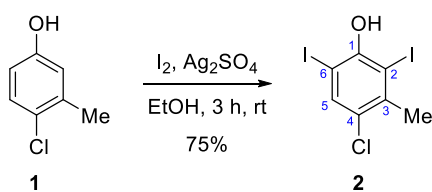
Ochratoxin A (CAS no. 303-47-9, 403.8 Da) was purchased from Sigma-Aldrich, ochratoxin B (CAS no. 4825-86-9, 369.4 Da) and ochratoxin C (CAS no. 4865-85-4, 431.9 Da) were from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada). *o*-Phenylenediamine, Tween-20 and H₂O₂ 30% (v/v) were provided by Sigma-Aldrich. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine was obtained from ZEULAB S.L. (Zaragoza). Goat anti-rabbit immunoglobulins and goat anti-mouse immunoglobulins were obtained from Rockland Inc. (Limerick, PA, USA, cat. no. 611-1102) and Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, PA, USA, cat. no. 115-005-008), respectively. As secondary antibodies, polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins antibody peroxidase conjugate from Dako (Glostrup, Denmark, cat. no. P026002-2) and polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins antibody peroxidase conjugate from Bio-Rad Laboratories (Madrid, cat. no. 170-6515) were used. Costar flat-bottom high-binding 96-well polystyrene ELISA plates were from Corning (Corning, NY,

USA, cat. no. 3590). ELISA absorbance was read with a PowerWave HT from BioTek Instruments (Winooski, VT, USA). Microplate wells were washed with an ELx405 microplate washer also from BioTek Instruments. Nitrocellulose membranes (pore size: 15 μm) were purchased from MDI Membrane Technologies (Ambala, India, cat. no. 70CNPH-N-SS40) and backing cards were purchased from Kenosha (Amstelveen, The Netherlands). Cellulose sample pad (cat. no. CFSP173000) and absorbent pad were obtained from Merck-Millipore (Billerica, MA, USA) and Ahlstrom-Munksjö (Manchester, UK), respectively. 40-nm GAM-modified gold nanoparticles (OD = 10) were purchased from BBI solutions (Crumlin, UK, cat. no. BA.GAM40). A ZX1010 system from Biodot (West Sussex, UK) was used for dispensing the immunoreagents onto the nitrocellulose membrane, immunostrips were manually assembled and cut using a CM5000 guillotine from Biodot. Immunostrips were scanned using an EPSON V39 scanner and RGB signal was processed using ImageJ (version 1.52a) free software.²⁴²

Samples were purchased from local supermarkets (Consum, Mercadona and Carrefour). Diluted samples were treated with poly(vinylpolypyrrolidone) from Sigma-Aldrich. The certified wine sample naturally contaminated with OTA was acquired from the Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM, Berlin, Germany). Data processing and graphical representation were carried out using SigmaPlot 14.0 from SPSS Inc (Chicago, IL, USA).

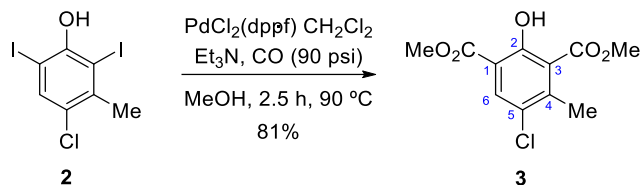
5.2 Hapten synthesis

5.2.1 Synthesis of ochratoxin α

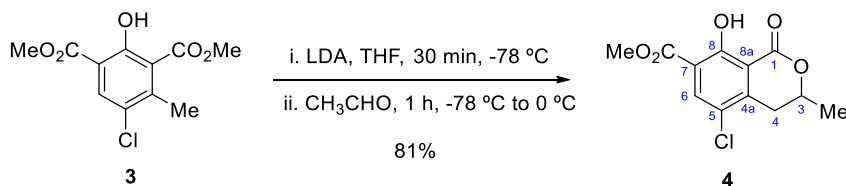


4-Chloro-2,6-diiodo-3-methylphenol (2). Absolute EtOH (31 mL) was added to a mixture of 4-chloro-3-methylphenol (**PCMC**, **1**) (1.78 g, 12.5 mmol), iodine (6.93 g, 27.3 mmol, 2.2 equiv) and Ag_2SO_4 (7.76 g 24.9 mmol, 2 equiv), and the mixture was stirred for 3 h at rt. Afterwards, the mixture was filtered and washed using CHCl_3 to separate the salts. The filtrate was washed with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10%) and brine. After drying over anhydrous MgSO_4 and evaporation of the solvent *in vacuo*, the residue was purified by chromatography, using hexane as eluent, to obtain compound **2** (3.72 g, 75%) as a white solid. **Mp** 91.0–92.0 $^\circ\text{C}$ (crystallised from cold hexane). **$^1\text{H NMR}$** (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 2.59 (s, 3H, Me-3), 5.83 (s, 1H, OH), 7.72 (s, 1H, H-5); **$^{13}\text{C NMR}$** (CDCl_3 , 75 MHz)

δ (ppm) 26.8 (Me-3), 77.6 (C-6), 90.5 (C-2), 125.2 (C-4), 137.9 (C-5), 140.3 (C-3), 152.6 (C-1); **HRMS** (TOF ESI⁻) calcd for C₇H₄ClI₂O [M-H]⁻ 392.8046, found 392.8042.

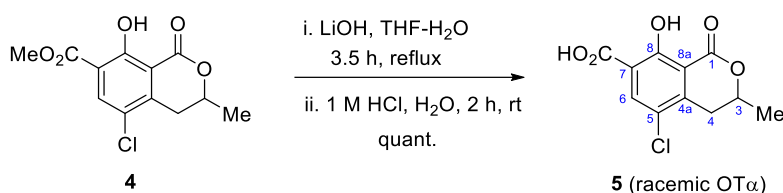


Dimethyl 5-chloro-2-hydroxy-4-methylbenzene-1,3-dicarboxylate (3). A mixture of diiodo phenol **2** (300 mg, 0.76 mmol) and PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (64.0 mg, 0.08 mmol, 0.1 equiv) in anhydrous MeOH (9 mL) contained in a Büchi 'Tiny Clave' reactor equipped with a magnetic stirring bar, was exhaustively degassed by vacuum-filling argon cycles and cooled to 0 °C. Then, Et₃N (0.53 mL, 3.8 mmol, 5 equiv) was quickly added under a stream of argon and the mixture re-subjected to pump/purge cycles at 0 °C, first with argon and then with CO. The CO pressure was set to 90 psi and the reaction mixture was stirred at 90 °C for 2.5 h. After this time, the reactor was cooled and vented, and the reaction mixture was transferred to a round-bottom flask with the aid of CH₂Cl₂ and concentrated to dryness under reduced pressure. The obtained residue was suspended in Et₂O and filtered, the filtrate was washed with HCl (1 M) and brine, and dried over anhydrous MgSO₄. The residue left after evaporation of the solvent was purified by chromatography on silica gel, using hexane-EtOAc mixtures (95:5 and 90:10) as eluent, to give compound **3** (158.4 mg, 81%) as a white solid. **Mp** 66.1–67.1 °C (crystallised from cold hexane). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 2.34 (s, 3H, Me-4), 3.95 (s, 6H, 2xOMe), 7.84 (s, 1H, H-6), 10.94 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 18.0 (Me-4), 52.7 (2xOCH₃), 111.5 (C-1), 125.0 (C-3), 125.1 (C-5), 130.6 (C-6), 141.6 (C-4), 156.8 (C-2), 166.8 (CO₂-1), 169.2 (CO₂-3); **HRMS** (TOF ESI⁺) calcd for C₁₁H₁₂ClO₅ [M+H]⁺ 259.0368, found 259.0356.



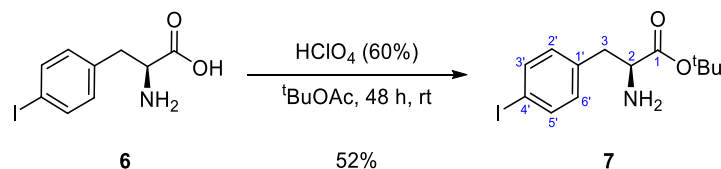
Methyl 5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxisochromane-7-carboxylate (4). A solution of dimethyl dicarboxylate **3** (135.6 mg, 0.52 mmol) in anhydrous THF (260 μ L) was dropwise added to a solution of LDA in THF [generated from diisopropylamine (193 μ L, 1.36 mmol, 2.6 equiv), BuLi (822 μ L of a 1.6 M solution in hexane, 1.31 mmol, 2.5 equiv) and anhydrous THF (1.5 mL)] at –78 °C under nitrogen. The orange mixture was stirred for 20–30 min at –78 °C and then dry acetaldehyde (400 μ L, 315 mg, 7.15 mmol, 14 equiv) was added. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 10 min and at 0 °C for 1 h. After this time, the resulting yellowish

reaction mixture was quenched by the addition of a 1:2 solution of AcOH in Et₂O (1 mL), then diluted with EtO₂ and washed with water, NaHCO₃ (5%) and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The obtained residue was purified by column chromatography, using mixtures of hexane-EtOAc (100:0 and 85:15) as eluent, to give compound **4** (115.0 mg, 81%) as a white semi-solid. **¹H NMR** (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.58 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, Me-3), 2.84 (dd, *J* = 17.4, 11.6 Hz, 1H, H-4), 3.27 (dd, *J* = 17.3, 3.2 Hz, 1H, H'-4), 3.94 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.42–4.92 (m, 1H, H-3), 8.10 (s, 1H, H-6), 12.19 (s, 1H, OH); **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 20.6 (Me-3), 32.6 (C-4), 52.6 (OCH₃), 75.1 (C-3), 111.2 (C-8a), 118.4 (C-7), 121.7 (C-5), 138.0 (C-6), 142.2 (C-4a), 161.1 (C-8), 165.0 (C-1), 167.9 (CO₂-7); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₁₂H₁₂ClO₅ [M+H]⁺ 271.0368, found 271.0371.



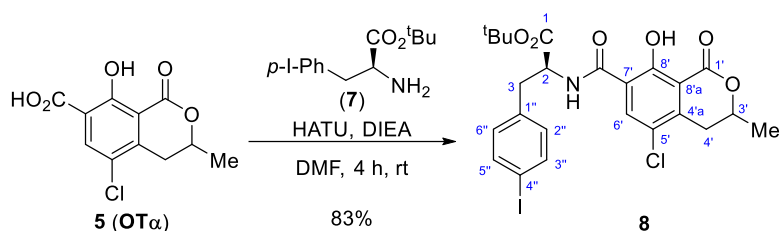
5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochroman-7-carboxylic acid (5, racemic OT α). A solution of LiOH·H₂O (115.0 mg, 2.73 mmol, 10 equiv) in water (1.20 mL) was added to a suspension of dihydroisocoumarin **4** (74.0 mg, 0.27 mmol) in anhydrous THF (910 μ L). The mixture was refluxed for 3.5 h and then cooled to 0 °C and acidified with a 1 M HCl aqueous solution (4.91 mL, 4.91 mmol, 18 equiv). The reaction mixture was stirred at rt for 2 h, diluted with water, and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated under reduced pressure to afford the acid **5** (69.9 mg, nearly quantitative yield) as a light brown amorphous solid. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ (ppm) 1.44 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, Me-3), 2.88 (dd, *J* = 17.3, 11.6 Hz, 1H, H-4), 3.20 (dd, *J* = 17.3, 3.2 Hz, 1H, H'-4), 4.75 (m, 1H, H-3), 7.99 (s, 1H, H-6); **¹³C NMR** (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ (ppm) 20.1 (Me-3), 32.2 (C-4), 74.4 (C-3), 112.5 (C-8a), 117.8 (C-7), 120.6 (C-5), 136.0 (C-6), 143.4 (C-4a), 160.5 (C-8), 165.4 (C-1), 167.3 (CO₂H); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₁₁H₁₀ClO₅ [M+H]⁺ 257.0211, found 257.0212.

5.2.2 Synthesis of hapten **b**

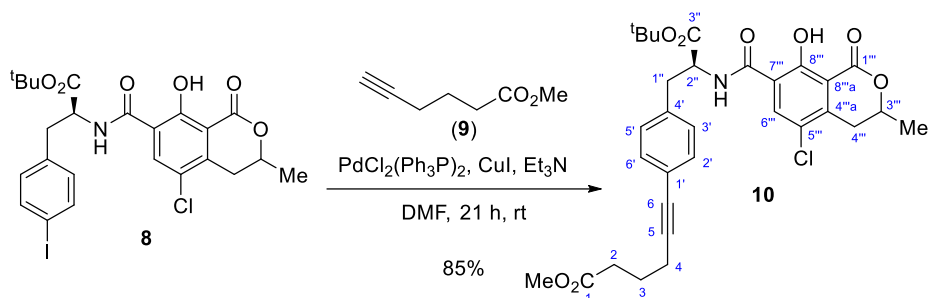


tert-Butyl (S)-2-amino-3-(4-iodophenyl)propanoate (7). HClO₄ (60%) (1.72 mL, 10.30 mmol, 3 equiv.) was added to a suspension of (S)-2-amino-3-(4-iodophenyl)propanoic acid **6** (1.00 g, 3.49 mmol) in ^tBuOAc (10 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 48 h and, after diluting the reaction mixture with EtOAc, the combined organic phases were washed with a

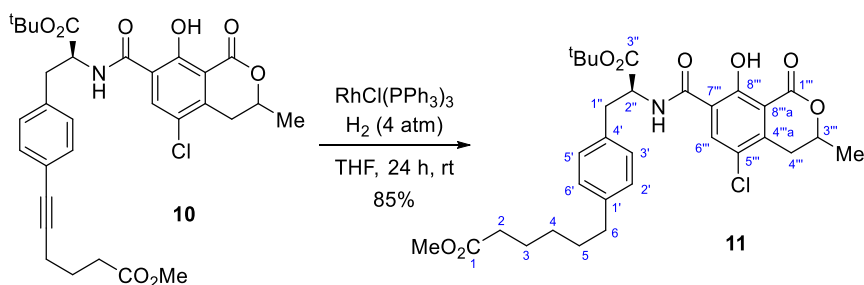
saturated Na₂CO₃ solution and brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford ester **7** (513 mg, 52%) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.43 (s, 9H, CMe₃), 2.78 (dd, *J* = 13.6, 7.7 Hz, 1H, H-3), 2.97 (dd, *J* = 13.8, 5.6 Hz, 1H, H-3), 3.57 (dd, *J* = 7.5, 5.6 Hz, 1H, H-2), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 7.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3' γ H-5'); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm); 28.0 (CMe₃), 40.6 (C-3), 56.1 (C-2), 81.4 (CMe₃), 92.0 (C-4'), 131.4 (C-2' and C-6'), 137.3 (C-1'), 137.5 (C-3' and C-5'), 174.1 (C-1); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₁₃H₁₉NiO₂ [M+H]⁺ 348.0455, found 348.0447.



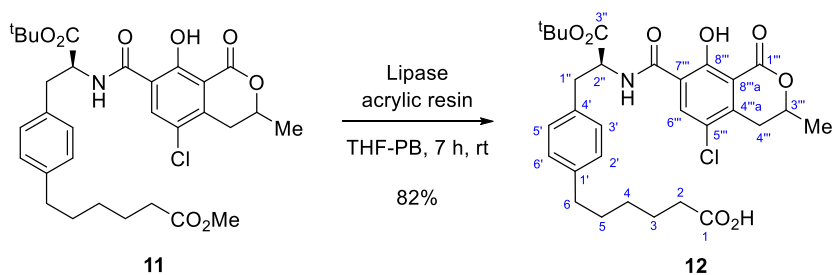
tert-Butyl (2S)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-(4-iodophenyl)propanoate (8). A solution of HATU (125.5 mg, 0.33 mmol, 1.5 equiv) and DIEA (80 μL, 0.44 mmol, 2 equiv) in anhydrous DMF (1.5 mL) was added to a solution of acid **5** (56.3 mg, 0.22 mmol) in anhydrous DMF (1.5 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at rt and then a solution of *tert*-butyl (*S*)-2-amino-3-(4-iodophenyl)propanoate (**7**) (153 mg, 0.44 mmol, 2 equiv) and DIEA (80 μL, 0.44 mmol, 2 equiv) in anhydrous DMF was added and stirred at rt for 4 h, after which the reaction was diluted with EtOAc and successively washed with aqueous solutions of HCl (1 M), LiCl (1.5%), NaHCO₃ (5%) and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was purified by column chromatography, using hexane-EtOAc-AcOH mixtures (100:0:0.3, 90:10:0.3 and 80:20:0.3) as eluent, to obtain compound **8** (107 mg, 83%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.43 (two s, each 4.5H, CMe₃ of each diastereoisomer), 1.61 (two d, *J* = 6.4 Hz, each 1.5H, Me-3' of each diastereoisomer), 2.84 and 2.89 (two dd, *J* = 17.4, 11.6 Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.07–3.24 (m, 2H, H₂-3), 3.30 (dd, *J* = 17.4, 3.5 Hz, 1H, H'-4'), 4.77 (m, 1H, H-3'), 4.94 (dt, *J* = 7.3, 6.0 Hz, 1H, H-2), 6.96 (br d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2'' and H-6''), 7.56–7.62 (m, 2H, H-3'' and H-5''), 8.44 (s, 1H, H-6'), 8.57 (m, 1H, NH), 12.78 (br s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 20.7 (Me-3'), 28.0 (CMe₃), 32.2 (C-4'), 37.6 (C-3), 54.3 (C-2), 75.9 (C-3'), 82.6 (CMe₃), 92.4 (C-4''), 110.0 (C-8'a), 120.7 (C-7'), 123.1 (C-5'), 131.5 (C-2'' and C-6''), 136.1 (C-1''), 137.4 (C-3'' and C-5''), 138.9 (C-6'), 140.6 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.1 (C-1); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₄H₂₆ClINO₆ [M+H]⁺ 586.0488, found 586.0459.



Methyl 6-(4-((2*S*)-3-(*tert*-butoxy)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-oxopropyl)phenyl)hex-5-ynoate (10). A mixture of iodinated derivative **8** (36.5 mg, 0.062 mmol), methyl hex-5-ynoate (**9**, 27.4 mg, 0.217 mmol, 3.5 equiv), PdCl₂(Ph₃P)₂ (5.1 mg, 7.3 · 10⁻³ mmol, 0.12 equiv) and CuI (2.2 mg, 11.5 · 10⁻³ mmol, 0.18 equiv) was cooled to 0 °C and purged by repeated vacuum-nitrogen cycles. Next, anhydrous DMF (730 μL) and Et₃N (540 μL, 3.87 mmol, 62 equiv) were added and the mixture was purged again. The reaction mixture was stirred at rt for 21 h, after which it was diluted with EtOAc and washed with aqueous solutions of HCl (1 M), LiCl (1.5%), NaHCO₃ (5%) and brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give a residue which was purified by column chromatography on silica gel, using hexane-EtOAc-AcOH mixtures (80:20:0.3, 70:30:0.3 and 50:50:0.3) as eluent, to obtain alkyne **10** (30.8 mg, 85%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers) ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.43 (br s, 9H, CMe₃), 1.60 (two d, *J* = 6.3 Hz, each 1.5H, Me-3'''), 1.87–1.98 (m, 2H, H₂-3), 2.48 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H₂-4), 2.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H₂-2), 2.84 and 2.89 (two dd, *J* = 17.5, 11.5 Hz, each 0.5H, H-4''') of each diastereoisomer), 3.19 (m, 2H, H₂-1''), 3.30 (dd, *J* = 17.4, 3.5 Hz, 1H, H'-4'''), 3.68 (s, 3H, CH₃O), 4.71–4.82 (m, 1H, H-3'''), 4.96 (dt, *J* = 7.3, 6.0 Hz, 1H, H-2''), 7.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3' and H-5'), 7.30 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 2H, H-2' and H-6'), 8.45 (s, 1H, H-6'''), 8.56 (m, 1H, NH), 12.76 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 18.9 (C-4), 20.7 (Me-3'''), 23.9 (C-3), 28.0 (CMe₃), 32.3 (C-4'''), 32.9 (C-2), 38.0 (C-1''), 51.6 (CH₃O), 54.5 (C-2''), 75.8 (C-3'''), 81.2 (C-6), 82.5 (CMe₃), 88.8 (C-5), 110.0 (C-8'''a), 120.8 (C-7'''), 122.3 (C-1'), 123.1 (C-5'''), 129.4 (C-3' and C-5'), 131.5 (C-2' and C-6'), 136.0 (C-4'), 139.0 (C-6'''), 140.6 (C-4'''a), 159.1 (C-8'''), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'''), 170.2 (C-3'''), 173.6 (C-1); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₃₁H₃₅ClNO₈ [M+H]⁺ 584.2046, found 584.2029.

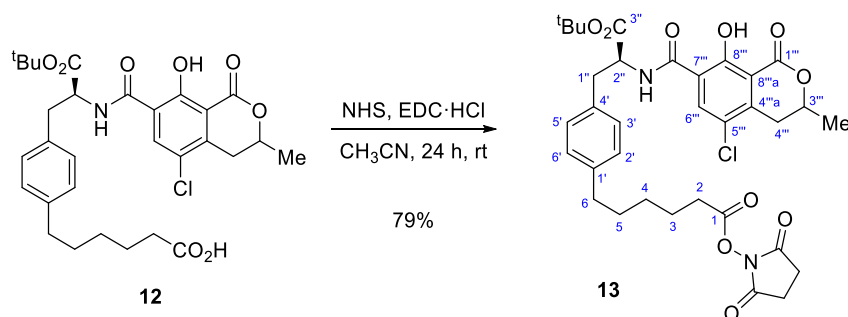


Methyl 6-(4-((2S)-3-(tert-butoxy)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-oxopropyl)phenyl)hexanoate (11). A solution of alkyne **10** (17.6 mg, 0.03 mmol) and $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ (4.2 mg, 4.5×10^{-3} mmol, 0.15 equiv) in anhydrous THF (1.3 mL) contained in a Büchi 'Tiny Clave' reactor was purged with hydrogen. The hydrogen pressure was adjusted to 4 atm and maintained under stirring at rt for 24 h. The reactor was then vented and the reaction mixture was concentrated to dryness under vacuum to obtain a residue which was purified by column chromatography, using hexane-EtOAc mixtures (90:10, 80:20 and 60:40) as eluent, to obtain compound **11** (15.0 mg, 85%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 1.31–1.38 (m, 2H, H_{2-4}), 1.42 (br s, 9H, CMe_3), 1.54–1.71 (m, 4H, H_{2-3} , H_{2-5}), 1.60 (two d, $J = 6.2$ Hz, each 1.5H, Me- $3'''$ of each diastereoisomer), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_2-2), 2.57 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_2-6), 2.83 and 2.88 (two dd, $J = 17.4$, 11.6 Hz, each 0.5H, H- $4'''$ of each diastereoisomer), 3.17 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_2-1''), 3.29 (dd, $J = 17.4$, 3.5 Hz, 1H, H'- $4'''$), 3.66 (s, 3H, OMe), 4.69–4.82 (m, 1H, H- $3'''$), 4.94 (dt, $J = 7.3$, 6.0 Hz, 1H, H- $2''$), 7.03–7.16 (m, 4H, H- $2'$, H- $3'$, H- $5'$ and H- $6'$), 8.46 (s, 1H, H- $6'''$), 8.54 (m, 1H, NH), 12.72 and 12.73 (two s, each 0.5H, OH of each diastereoisomer); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 20.7 (Me- $3'''$), 24.7 (C-3), 27.9 (CMe_3), 28.7 (C-4), 31.0 (C-5), 32.3 (C- $4'''$), 34.0 (C-2), 35.3 (C-6), 37.7 (C- $1''$), 51.4 (OMe), 54.7 (C- $2''$), 75.8 (C- $3'''$), 82.2 (CMe_3), 110.0 (C- $8'''a$), 121.0 (C- $7'''$), 123.0 (C- $5'''$), 128.4 (C- $3'$ and C- $5'$), 129.4 (C- $2'$ and C- $6'$), 133.5 (C- $4'$), 139.0 (C- $6'''$), 140.5 (C- $4'''a$), 141.1 (C- $1'$), 159.1 (C- $8'''$), 162.1 (CONH), 169.7 (C- $1'''$), 170.5 (C- $3'''$), 174.2 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{ClNO}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 588.2359, found 588.2358.



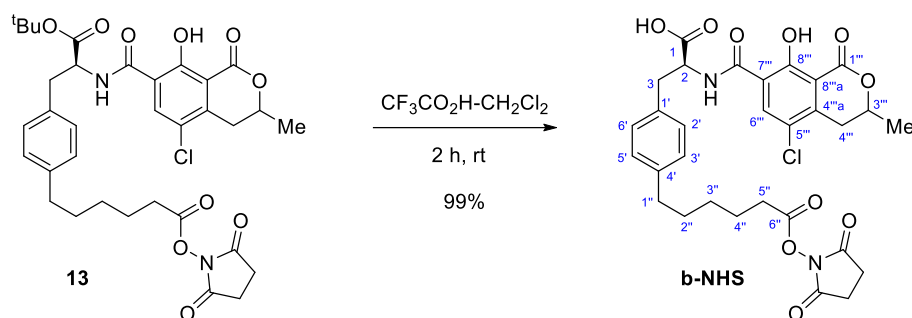
6-(4-((2S)-3-(tert-Butoxy)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-oxopropyl)phenyl)hexanoic acid (12). A suspension of methyl ester **11** (13.4 mg, 0.023 mmol) in THF (160 μL) and lipase from *Candida antarctica* immobilised on acrylic resin

(Novozyme 435, 26.4 mg) in a phosphate buffer solution with pH = 7.4 (630 μ L), was stirred at rt for 7 h. The mixture was filtered and the resin was washed with water and EtOAc. The aqueous phase was acidified with a 1 M aqueous solution of HCl until pH 2-3 and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated to dryness under reduced pressure to obtain an oily residue which was purified by column chromatography on silica gel, using $CHCl_3$ -MeOH mixtures (100:0, 95:5 and 90:10) as eluent, to give recovered methyl ester **11** (1.1 mg, 8.2%), followed by acid **12** (9.9 mg, 82% based on recovered starting material) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm) 1.31–1.37 (m, 2H, H_{2-4}), 1.43 (s, 9H, CMe_3), 1.54–1.70 (m, 4H, H_{2-3} , H_{2-5}), 1.60 (br d, $J = 6.2$ Hz, , Me-3'''), 2.32 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{2-2}), 2.57 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_{2-6}), 2.78–2.92 (m, 1H, H-4'''), 3.17 (m, 2H, $H_{2-1''}$), 3.29 (dd, $J = 17.4, 3.3$ Hz, 1H, H'-4'''), 4.68–4.82 (m, 1H, H-3'''), 4.88–5.00 (m, 1H, H-2''), 7.02–7.16 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 8.45 (s, 1H, H-6'''), 8.56 (m, 1H, NH), 12.73 (br s, 1H, OH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm) 20.7 (Me-3'''), 24.5 (C-3), 28.0 (CMe_3), 28.4 (C-4), 30.9 (C-5), 30.9 (C-2), 32.2 (C-4'''), 33.7 (C-2), 35.2 (C-6), 37.8 (C-1''), 54.7 (C-2''), 75.9 (C-3'''), 82.3 (CMe_3), 110.0 (C-8'''a), 120.9 (C-7'''), 123.0 (C-5'''), 128.4 (C-3' and C-5'), 129.4 (C-2' and C-6'), 133.5 (C-4'), 139.0 (C-6'''), 140.6 (C-4'''a), 141.1 (C-1'), 159.1 (C-8'''), 162.2 (CONH), 169.8 (C-1'''), 170.5 (C-3''), 179.2 (CO_2H); HRMS (TOF ESI+) calcd for $C_{30}H_{37}ClNO_8$ $[M+H]^+$ 574.2202, found 574.2220.



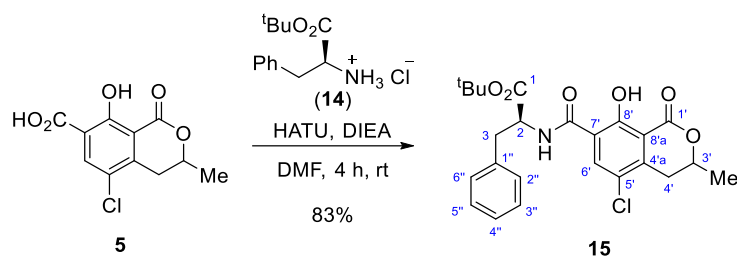
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 6-(4-((2S)-4-(tert-butoxy)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3,4-dioxobutyl)phenyl)hexanoate (13). A solution of acid **12** (10.2 mg, 0.018 mmol), NHS (2.2 mg, 0.019 mmol, 1.1 equiv) and EDC·HCl (3.7 mg, 0.019 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH_3CN (1.0 mL) was stirred at rt for 24 h under nitrogen atmosphere. After this time, the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with water, $NaHCO_3$ (5%) and brine. After evaporating to dryness, the residue was chromatographed through a small column of silica gel, using CH_2Cl_2 as eluent, to obtain *N*-hydroxysuccinimidyl ester **13** (9.6 mg, 79%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm) 1.42 (br s, 9H, CMe_3), 1.43–1.49 (m, 2H, H_{2-4}), 1.58–1.67 (m, 2H, H_{2-5}), 1.60 (two d, each 1.5H, $J = 6.4$ Hz, Me-3''' of each diastereoisomer), 1.77 (quint, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_{2-3}), 2.59 (br t, 4H, $J = 7.5$ Hz, H_{2-2} and H_{2-6}), 2.79–

2.90 (m, 5H, H-4'''), COCH₂CH₂CO), 3.11–3.22 (m, 2H, H₂-1''), 3.29 (dd, *J* = 17.4, 3.5 Hz, 1H, H-4'''), 4.69–4.81 (m, 1H, H-3'''), 4.89–4.97 (m, 1H, H-2''), 7.06–7.16 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 8.45 (s, 1H, H-6'''), 8.54 (m, 1H, NH), 12.73 (br s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 20.7 (Me-3'''), 24.4 (C-3), 25.6 (COCH₂CH₂CO), 28.0 (CMe₃), 28.4 (C-4), 30.8 (C-5), 30.8 (C-2), 32.3 (C-4'''), 35.2 (C-6), 37.8 (C-1''), 54.7 (C-2''), 75.9 (C-3'''), 82.2 (CMe₃), 110.0 (C-8''')a), 121.0 (C-7'''), 123.0 (C-5'''), 128.4 (C-3' and C-5'), 129.5 (C-2' and C-6'), 133.6 (C-4'), 139.0 (C-6'''), 140.5 (C-4''')a), 140.9 (C-1'), 159.1 (C-8'''), 162.1 (CONH), 168.6 (C-1), 169.1 (COCH₂CH₂CO), 169.8 (C-1'''), 170.5 (C-3''); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₃₄H₄₀ClN₂O₁₀ [M+H]⁺ 671.2366, found 671.2349.

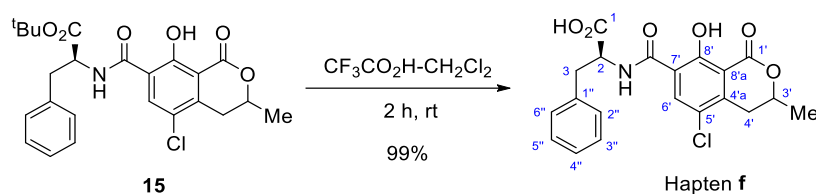


(2S)-2-(5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-(4-(6-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-6-oxohexyl)phenyl)propanoic acid (b-NHS). Trifluoroacetic acid (370 μL, 4.8 mmol) was dropwise added to a solution of *tert*-butyl ester **13** (9.0 mg, 0.013 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (760 μL) and the resulting mixture was stirred for 2 h at rt. After this time, the reaction mixture was concentrated to dryness under reduced pressure to give **b-NHS** (7.9 mg, nearly quantitative) as a resinous and brownish material (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm) 1.42 (m, 2H, H₂-3''), 1.57–1.68 (m, 2H, H₂-2''), 1.60 (two d, each 1.5H, *J* = 6.4 Hz, Me-3'''), 1.75 (m, 2H, H₂-4''), 2.59 (m, 4H, H₂-1'' and H₂-5''), 2.78–2.91 (m, 5H, H-4'''), COCH₂CH₂CO), 3.16–3.34 (m, 3H, H₂-3 and H'-4'''), 4.77 (m, 1H, H-3'''), 5.00–5.04 (m, 1H, H-2), 7.06–7.18 (m, 4H, H-2', H-3', H-5' and H-6'), 8.42 (m, 1H, H-6'''), 8.51 and 8.58 (two m, each 0.5H, NH of each diastereoisomer); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 20.6 (Me-3'''), 24.4 (C-4'''), 25.6 (COCH₂CH₂CO), 28.2 (C-3''), 30.7 (C-2''), 30.8 (C-5''), 32.2 (C-4'''), 35.1 (C-1''), 36.9 (C-3), 54.4 (C-2), 75.9 (C-3'''), 110.0 (C-8''')a), 120.3 (C-7'''), 123.1 (C-5'''), 128.7 (C-3' and C-5'), 129.3 (C-2' and C-6'), 133.0 (C-1'), 138.9 (C-6'''), 140.9 (C-4''')a), 141.2 (C-4'), 159.0 (C-8'''), 163.1 (CONH), 168.6 (C-6''), 169.3 (COCH₂CH₂CO), 169.7 (C-1'''), 174.3 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₃₀H₃₂ClN₂O₁₀ [M+H]⁺ 615.1740, found 615.1732.

5.2.3 Synthesis of hapten f

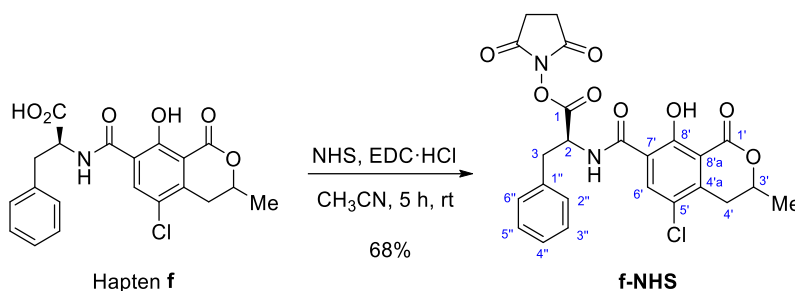


tert-Butyl (5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carbonyl)-L-phenylalaninate (15). A solution of HATU (91.3 mg, 0.24 mmol, 1.5 equiv) and DIEA (60 μ L, 0.32 mmol, 2 equiv) in anhydrous DMF (1.1 mL) was added to a solution of **5** (40 mg, 0.16 mmol) in anhydrous DMF (1.1 mL) and the resulting mixture was stirred at rt for 2 h. Next, a solution of hydrochloride **14** (82.5 mg, 0.32 mmol, 2 equiv) and DIEA (60 μ L, 0.324 mmol, 2 equiv) in anhydrous DMF (1.1 mL) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 4 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with aqueous solutions of HCl (1 M), LiCl (1.5%), NaHCO₃ (5%) and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to dryness. The obtained residue was purified by chromatography on silica gel, using hexane-EtOAc-AcOH mixtures (100:0:0.3, 90:10:0.3 and 80:20:0.3) as eluent, to obtain compound **15** (59.5 mg, 83%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.46 (s, 9H, CMe₃), 1.62–1.64 and 1.63–1.65 (two d, J = 6.3, each 1.5H, Me-3' of each diastereoisomer), 2.84–2.89 and 2.90–2.95 (two dd, J = 17.7, 11.7 Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.25 (m, 2H, H₂-3), 3.33 (dd, J = 17.3, 3.4 Hz, 1H, H'-4'), 4.80 (m, 1H, H-3'), 5.01 (dt, J = 7.4, 6.0 Hz, 1H, H-2), 7.20–7.38 (m, 5H, Ph), 8.49 (s, 1H, H-6'), 8.58–8.62 (two d, J = 6.9 Hz, each 0.5H, NH of each diastereoisomer), 12.77 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 20.6 (Me-3'), 27.9 (CMe₃), 32.2 (C-4'), 38.1 (C-3), 54.5 (C-2), 75.8 (C-3'), 82.3 (CMe₃), 110.0 (C-8'a), 120.8 (C-7'), 123.0 (C-5'), 126.9 (C-4''), 128.3 (C-2'' and C-6''), 129.5 (C-3'' and C-5''), 136.2 (C-1''), 138.9 (C-6'), 140.5 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.3 (C-1); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₄H₂₇ClNO₆ [M+H]⁺ 460.1521, found 460.1522.



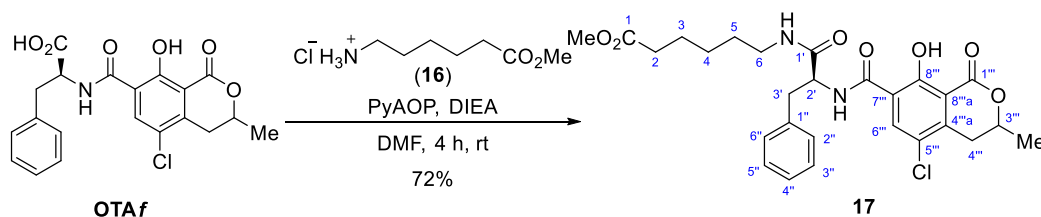
(5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carbonyl)-L-phenylalanine (Hapten f). Trifluoroacetic acid (1.25 mL) was added to a solution of *tert*-butyl ester **15** (20.5 mg, 0.045 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (2 mL). The reaction mixture was kept under stirring at rt for 2 h and then concentrated to dryness under reduced pressure to give hapten **f** (17.6 mg, 99%) as a cream solid (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.50 (d, J = 6.2 Hz, 3H,

Me-3'), 2.72 and 2.78 (two dd, $J = 17.5, 11.5$ Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.06–3.30 (m, 3H, H₂-3 and H'-4'), 4.65 (m, 1H, H-3') 4.89–4.98 (m, 1 H, H-2) 7.13–7.23 (m, 5H, Ph) 8.32 (s, 1H, H-6'), 8.41 (two d, $J = 6.8$ Hz, each 0.5H, NH of each diastereoisomer), 12.64 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 20.6 (Me-3'), 32.2 (C-4'), 37.3 (C-3), 54.3 (C-2), 75.9 (C-3'), 110.0 (C-8'a), 120.2 (C-7'), 123.2 (C-5'), 127.3 (C-4''), 128.3 (C-2'' and C-6''), 129.3 (C-3'' and C-5''), 135.7 (C-1''), 139.0 (C-6'), 141.0 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 163.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 175.1 (C-1); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₀H₁₉ClNO₆ [M+H]⁺ 404.0895, found 404.0901.



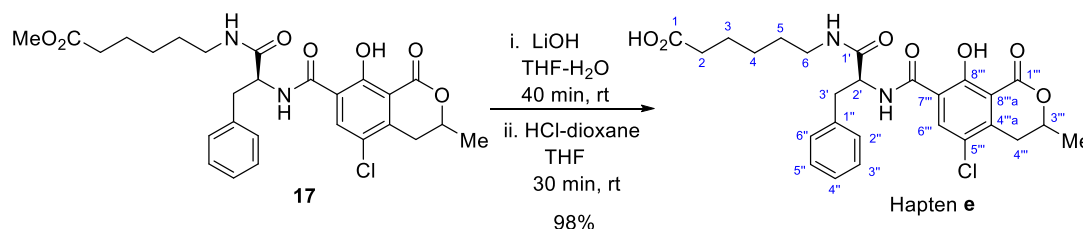
2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl (5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxyl)-L-phenylalaninate (f-NHS). A solution of EDC·HCl (17.0 mg, 0.089 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous CH₃CN (1 mL) was added dropwise to a solution of **f** (30 mg, 0.074 mmol) and NHS (9.4 mg, 0.082 mmol, 1.1 equiv) in CH₃CN (1 mL) under nitrogen. The reaction mixture was stirred at rt for 6 h and then diluted with EtOAc and washed with water, NaHCO₃ (5%) and brine. Evaporation of the solvent under reduced pressure gave the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten **f** (**f-NHS**) (25.2 mg, 68%) as a viscous oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.54–1.61 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, Me-3') 2.78–2.90 (m, 5H, H-4', COCH₂CH₂CO) 3.22–3.37 (m, 2H, H₂-3) 3.40–3.51 (m, 1H, H-4') 4.74 (m, 1H, H-3') 5.30–5.42 (m, 1H, H-2), 7.21–7.39 (m, 5H, Ph) 8.37–8.48 (m, 2H, H-6' and NH) 12.70 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 20.6 (Me-3'), 25.6 (COCH₂CH₂CO), 32.2 (C-4'), 37.6 (C-3), 52.3 (C-2), 75.9 (C-3'), 110.0 (C-8'a), 120.0 (C-7'), 123.2 (C-5'), 127.5 (C-4''), 128.7 (C-2'' and C-6''), 129.6 (C-3'' and C-5''), 134.6 (C-1''), 139.1 (C-6'), 141.0 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 162.6 (CONH), 167.2 (COCH₂CH₂CO), 168.6 (C-1), 169.7 (C-1'); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₀H₁₇ClNO₅ [M-C₄H₄NO₃]⁺ 386.0790, found 386.0785.

5.2.4 Synthesis of hapten e



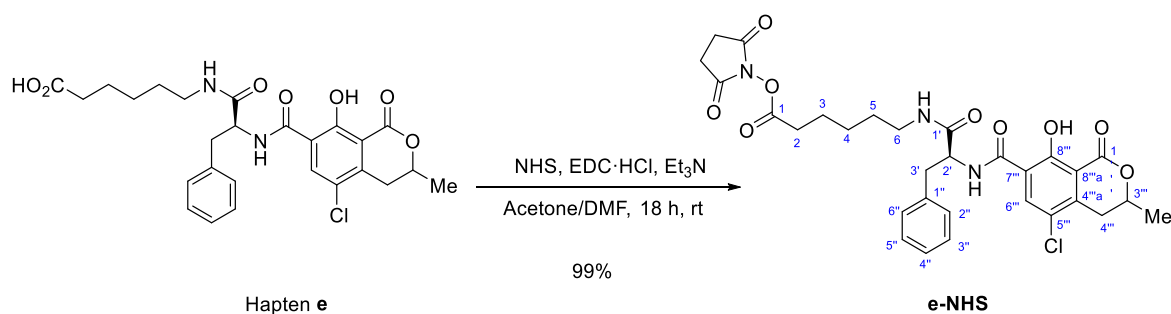
Methyl 6-((2S)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-phenylpropanamido)hexanoate (17). DIEA (25 μ L, 0.143 mmol, 3.25 equiv) was added to a

solution of **f** (18 mg, 0.044 mmol) and 6-methoxy-6-oxohexan-1-ammonium chloride (**16**, 9.4 mg, 0.052 mmol, 1.1 equiv) in anhydrous DMF (600 μ L) under nitrogen. The resulting mixture was stirred for 10 min and then a solution of PyAOP (34 mg, 0.065 mmol, 1.5 equiv) in anhydrous DMF (600 μ L) was added. After stirring at rt for 4 h, the mixture was diluted with EtOAc and washed with aqueous solutions of LiCl (1.5%), NaHCO₃ (5%) and brine, and dried over anhydrous MgSO₄. Chromatography of the residue left after evaporation of the solvent, using mixtures of CHCl₃-MeOH (100:0 and 99:1) as eluent, gave amide **17** (16.8 mg, 72%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.11–1.28 (m, 2H, H₂-4), 1.31–1.44 (m, 2H, H₂-5), 1.49–1.63 (m, 2H, H₂-3), 1.61 (two d, J = 6.4 Hz, each 1.5H, Me-3''') of each diastereoisomer), 2.17–2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H₂-2), 2.86 (two dd, J = 17.5, 11.6 Hz, each 0.5H, H-4''') of each diastereoisomer), 3.04–3.37 (m, 5H, H₂-6, H₂-3' and H'-4'''), 3.66 (s, 3H, OMe), 4.62–4.89 (m, 2H, H-3''' and NH), 5.83 (m, 1H, H-2'), 7.12–7.40 (m, 5H, Ph), 8.41 (s, 1H, H-6'''), 8.59 (d, J = 7.4 Hz, 1H, NH), 12.81 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 20.7 (Me-3'''), 24.4 (C-3), 26.2 (C-4), 28.9 (C-5), 32.2 (C-4'''), 33.7 (C-2), 38.4 (C-3'), 39.2 (C-6), 51.5 (OMe), 55.7 (C-2'), 75.9 (C-3'''), 110.1 (C-8''')a), 120.5 (C-7'''), 123.1 (C-5'''), 127.0 (C-4''), 128.6 (C-2'' and C-6''), 129.3 (C-3'' and C-5''), 136.8 (C-1''), 138.8 (C-6'''), 140.8 (C-4''')a), 159.0 (C-8'''), 162.7 (CONH), 169.7 (C-1'''), 170.4 (C-1'), 174.0 (C-1); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₇H₃₂ClN₂O₇ [M+H]⁺ 531.1893, found 531.1878.

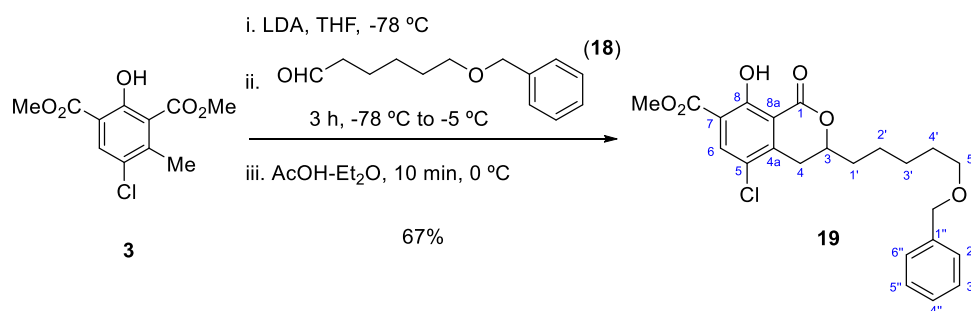


6-((2S)-2-(5-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochroman-7-carboxamido)-3-phenyl propanamido)hexanoic acid (Hapten e). A solution of LiOH·H₂O (13 mg, 0.31 mmol, 10 equiv) in H₂O (700 μ L) was added to a solution of methyl ester **17** (16.6 mg, 0.031 mmol) in THF (700 μ L) and the mixture was stirred at rt for 40 min. The reaction mixture was then cooled in an ice bath and acidified with a 1 M aqueous solution of KHSO₄ to a pH of approximately 2, diluted with EtOAc, washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄. The residue obtained after evaporation of the solvent under reduced pressure was dissolved in anhydrous THF (1.2 mL) and treated with a drop of 4 M HCl in dioxane. After stirring at rt for 30 min, the solvent was removed in vacuo to dryness to give hapten **e** (15.7 mg, 98%) as a yellowish semi-solid (a 1: 1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) 1.18–1.28 (m, 2H, H₂-4), 1.30–1.40 (m, 2H, H₂-5), 1.42–1.52 (m, 2H, H₂-3), 1.46–1.47 (two d, J = 6.4 Hz, each 1.5H, Me-3''') of each diastereoisomer), 2.14–2.20 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H₂-2), 2.88–3.08 (m, 6H, H-4''', H₂-3', H₂-6 and NH), 3.22 (dd, J = 17.2, 3.1 Hz, 1H, H'-4'''), 4.69–4.76 (m, 1H, H-3'''), 4.84 (m, 1H, H-2'), 7.15–7.28 (m,

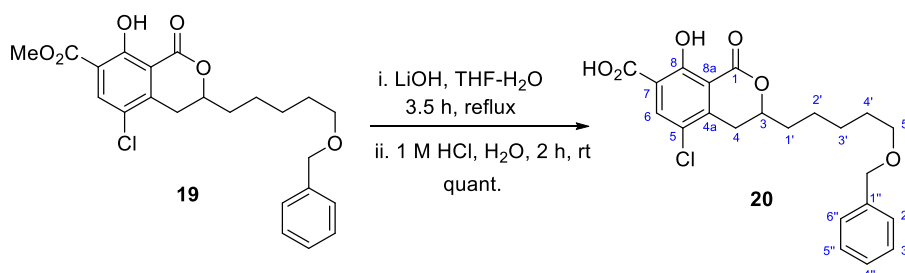
5H, Ph), 8.08 and 8.09 (two s, each 0.5H, H-6''' of each diastereoisomer), 8.14 and 8.60 (two m, each 0.5H, NH of each diastereoisomer); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ (ppm) 20.1 (Me-3'''), 24.2 (C-3), 25.9 (C-4), 28.6 (C-5), 31.6 (C-4'''), 33.6 (C-2), 38.1 (C-3'), 38.4 (C-6), 54.5 (C-2'), 75.4 (C-3'''), 111.3 (C-8'''a), 120.2 (C-7'''), 121.4 (C-5'''), 126.4 (C-4''), 128.1 (C-2'' and C-6''), 129.2 (C-3'' and C-5''), 136.0 (C-1''), 139.2 (C-6'''), 141.6 (C-4'''a), 158.4 (C-8'''), 162.6 (CONH), 169.9 (C-1'''), 170.0 (C-1'), 174.4 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₂₆H₃₀ClN₂O₇ [M+H]⁺ 517.1736, found 517.1731.



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 6-((2S)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochroman-7-carboxamido)-3-phenylpropanamido)hexanoate (e-NHS). A solution of EDC·HCl (37.0 mg, 0.193 mmol, 2.0 equiv) in anhydrous DMF (0.5 mL) was added to a solution of hapten **e** (50 mg, 0.097 mmol), NHS (22.3 mg, 0.193 mmol, 2.0 equiv) and Et₃N (26.0 μL, 0.193 mmol, 2.0 equiv) in anhydrous acetone (2.0 mL). The mixture was stirred at rt for 18 h and then diluted with EtOAc, washed with aqueous solutions of LiCl (1.5%), HCl (1 M) and brine, and dried over anhydrous MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of hapten **e** (**e-NHS**) (59.1 mg, 99%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm) 1.29–1.37 (m, 2H, H₂-4), 1.39–1.47 (m, 2H, H₂-5), 1.60 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, Me-3'''), 1.64–1.78 (m, 2H, H₂-3), 2.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H₂-2), 2.76–2.93 (m, 5H, H-4''', COCH₂CH₂CO), 3.06–3.37 (m, 5H, H'-4''', H₂-3' and H₂-6), 4.68–4.91 (m, 2H, H-3''' and NH), 6.04 (m, 1H, H-2'), 7.16–7.35 (m, 5H, Ph), 8.38 (s, 1H, H-6'''), 8.60 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH), 12.79 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 20.6 (Me-3'''), 24.1 (C-3), 25.4 (C-4), 25.6 (COCH₂CH₂CO), 28.5 (C-5), 30.8 (C-2), 32.2 (C-4'''), 38.5 (C-3'), 39.0 (C-6), 55.5 (C-2'), 75.9 (C-3'''), 110.1 (C-8'''a), 120.7 (C-5), 123.1 (C-5'''), 126.9 (C-4''), 128.6 (C-2'' and C-6''), 129.3 (C-3'' and C-5''), 136.8 (C-1''), 138.7 (C-6'''), 140.8 (C-4'''a), 159.0 (C-8'''), 162.6 (CONH), 169.3 (COCH₂CH₂CO), 169.7 (C-1'''), 168.4 (C-1), 170.5 (C-1'); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₃₀H₃₃N₃ClO₉ [M+H]⁺ 614.1900, found 614.1892.

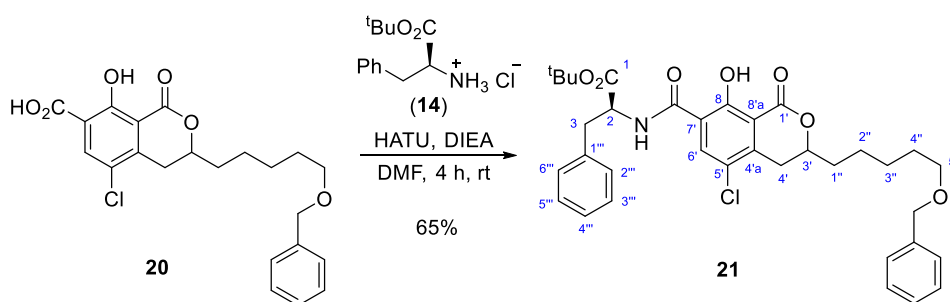
5.2.5 Synthesis of hapten **d**

Methyl 3-(5-(benzyloxy)pentyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochromane-7-carboxylate (19). A solution of diester **3** (117.0 mg, 0.45 mmol) in anhydrous THF (280 μ L) was added dropwise to a solution of LDA in THF [generated from diisopropylamine (185 μ L, 1.25 mmol, 2.75 equiv) and 1.6 M BuLi in hexane (710 μ L, 1.14 mmol, 2.5 equiv) in THF (1.4 mL)] at -78 $^{\circ}$ C under nitrogen. The mixture was maintained at the same temperature for 30 min and then a solution of aldehyde **18** (150 mg, 0.73 mmol, 1.6 equiv) in anhydrous THF (150 μ L) was added. The reaction mixture was stirred at -78 $^{\circ}$ C for 15 min and then allowed to warm slowly to 5 $^{\circ}$ C (about 3 hours). At the end of this time, the reaction mixture was treated with a 1:2 mixture of AcOH-Et₂O and stirred for 10 minutes at 0 $^{\circ}$ C, diluted with EtOAc and washed with water and brine and dried over anhydrous MgSO₄. Chromatographic purification of the residue left after evaporation of the solvent under reduced pressure, using hexane-EtOAc-AcOH mixtures (100:0:0.3, 95:5:0.3 and 85:15:0.3) as eluent, afforded compound **19** (109.0 mg, 67%) as a yellowish oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.30–1.93 (m, 8H, H₂-1', H₂-2', H₂-3' and H₂-4'), 2.77 (dd, J = 17.3, 11.7 Hz, 1H, H-4), 3.16 (dd, J = 17.3, 3.4 Hz, 1H, H'-4), 3.43 (t, J = 6.3 Hz, 2H, H₂-5'), 3.89 (s, 3H, OMe), 4.44 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.45–4.58 (m, 1H, H-3), 6.98–7.46 (m, 5H, Ph), 8.05 (s, 1H, H-6), 12.14 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 24.5 (C-2'), 25.9 (C-3'), 29.5 (C-4'), 30.9 (C-4), 34.5 (C-1'), 52.5 (OMe), 70.0 (C-5'), 72.9 (OCH₂Ph), 78.5 (C-3), 111.4 (C-8a), 118.3 (C-7), 121.7 (C-5), 127.5 (C-4''), 127.6 (C-2'' and C-6''), 128.3 (C-3'' and C-5''), 137.9 (C-6), 138.5 (C-1''), 142.3 (C-4a), 161.0 (C-8), 165.0 (C-1), 167.9 (CO₂); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₃H₂₆ClO₆ [M+H]⁺ 433.1412, found 433.1415.



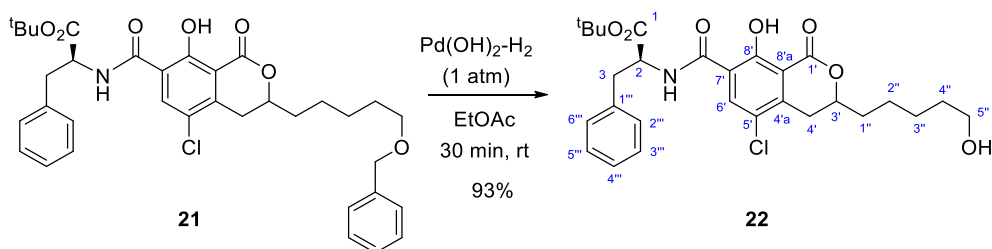
3-(5-(Benzyloxy)pentyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochromane-7-carboxylic acid (20). A solution of LiOH·H₂O (135.0 mg, 3.21 mmol, 10 equiv) in water (1.40 mL) was added to a solution

of dihydroisocoumarin **19** (139.0 mg, 0.32 mmol) in anhydrous THF (1.30 mL) and the mixture was heated at reflux for 3.5 h. The reaction mixture was then cooled in an ice bath and treated with a 1 M aqueous solution of HCl (5.80 mL, 5.80 mmol, 18 equiv), stirred at 0 °C for 2 h, diluted with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to dryness under reduced pressure to obtain acid **20** (134.5 mg, 100%) as a yellowish semi-solid, whose ¹H NMR showed to have a sufficiently high purity to be used in the next stage without further purification. ¹H NMR (MeOD, 300 MHz) δ (ppm) 1.42–1.91 (m, 8H, H₂-1', H₂-2', H₂-3' and H₂-4'), 2.87 (dd, *J* = 17.3, 11.7 Hz, 1H, H-4), 3.21–3.29 (dd, *J* = 17.3, 3.0 Hz, H'-4), 3.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H₂-5'), 4.50 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.56 (m, 1H, H-3), 7.21–7.37 (m, 5H, Ph), 8.12 (s, 1H, H-6); ¹³C NMR (MeOD, 75 MHz) δ (ppm) 25.8 (C-2'), 27.1 (C-3'), 30.7 (C-4'), 32.5 (C-4), 35.7 (C-1'), 71.4 (C-5'), 74.0 (OCH₂Ph), 79.7 (C-3), 114.0 (C-8a), 118.6 (C-7), 122.8 (C-5), 128.8 (C-4''), 129.0 (C-2'' and C-6''), 129.5 (C-3'' and C-5''), 138.2 (C-6), 140.0 (C-1''), 145.5 (C-4a), 163.0 (C-8), 167.5 (C-1), 169.8 (CO₂H); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₂H₂₄ClO₆ [M+H]⁺ 419.1256, found 419.1251.

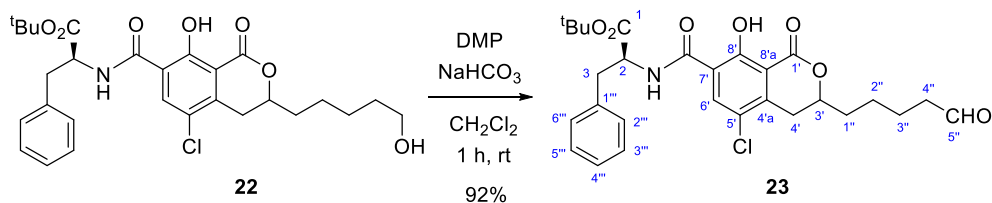


tert-Butyl (3-(5-(benzyloxy)pentyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochromane-7-carbonyl)-L-phenylalaninate (21). A solution of HATU (123.5 mg, 0.33 mmol, 1.5 equiv) in anhydrous DMF (1.5 mL) and DIEA (80 μL, 0.44 mmol, 2 equiv) were added to a solution of acid **20** (91.0 mg, 0.22 mmol) in anhydrous DMF (1.5 mL) under nitrogen and the resulting mixture was stirred at rt for 2 h. Next, a solution of hydrochloride **14** (108 mg, 0.44 mmol, 2 equiv) and DIEA (80 μL, 0.44 mmol, 2 equiv) in anhydrous DMF (1.1 mL) was added and the mixture stirred at the same temperature for 4 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed successively with aqueous solutions of HCl (1 M), LiCl (1.5%), NaHCO₃ (5%) and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue obtained was purified by chromatography on silica gel, using hexane-EtOAc-AcOH mixtures (100:0:0.3, 90:10:0.3, and 80:20:0.3) as eluent to obtain amide **21** (87 mg, 65%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.28–1.91 (m, 8H, H₂-1'', H₂-2'', H₂-3'', H₂-4''), 1.36 (s, 9H, CMe₃), 2.69–2.86 (two dd, *J* = 17.3, 11.7 Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.08–3.23 (m, 3H, H'-4' and H₂-3), 3.43 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H₂-5''), 4.44 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.47–4.59

(m, 1H, H-3'), 4.86–4.96 (m, 1H, H-2), 7.04–7.32 (m, 10H, 2xPh), 8.39 (s, 1H, H-6'), 8.50 (br d, $J = 5.3$ Hz, 1H, NH), 12.66 (s, 1H, OH); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 24.5 (C-2''), 25.9 (C-3''), 27.9 (CMe_3), 29.5 (C-4''), 30.6 (C-4'), 34.6 (C-1''), 38.1 (C-3), 54.6 (C-2), 70.0 (C-5''), 72.9 (OCH_2Ph), 79.2 (C-3'), 82.3 (CMe_3), 110.1 (C-8'a), 120.8 (C-7'), 123.0 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 127.5 (C-4 Ph), 127.6 (C-2 and C-6 Ph), 128.3 (C-2''', C-6''', C-3 and C-5 Ph), 129.5 (C-3''' and C-5'''), 136.3 (C-1'''), 138.5 (C-1 Ph), 138.9 (C-6'), 140.6 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.3 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{ClNO}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 622.2566, found 622.2570.

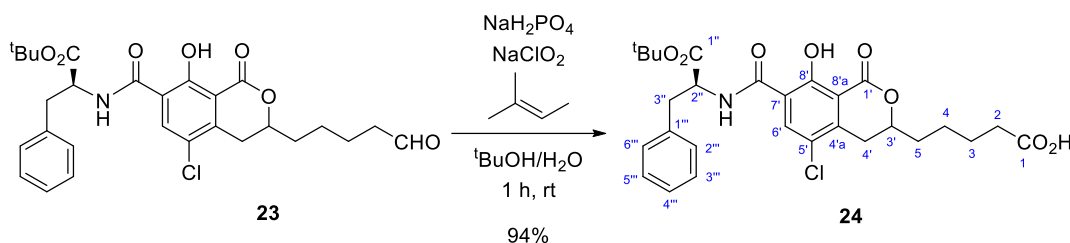


tert-Butyl (5-chloro-8-hydroxy-3-(5-hydroxypentyl)-1-oxoisochromane-7-carbonyl)-L-phenylalaninate (22). A suspension of $\text{Pd}(\text{OH})_2$, (20% on carbon, 50% water wet, 44 mg, 0.06 mmol, 0.4 equiv) and benzyl ether **21** (85 mg, 0.14 mmol) in EtOAc (4.8 mL) was purged with repeated vacuum-hydrogen cycles and subsequently stirred vigorously under a pressure of H_2 of 1 atm (balloon) at rt for 30 min. The reaction mixture was filtered through a pad of silica gel using EtOAc for washing. The filtrate and washings were concentrated to dryness to provide alcohol **22** (67.2 mg, 93%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 1.40–1.98 (m, 8H, H_2 -1'', H_2 -2'', H_2 -3'', H_2 -4''), 1.42 (s, 9H, CMe_3), 2.78–2.94 (two dd, $J = 17.4, 11.8$ Hz, 1H, H-4' of each diastereoisomer), 3.14–3.33 (m, 3H, H-4' and H_2 -3), 3.67 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, H_2 -5''), 4.51–4.69 (m, 1H, H-3'), 4.96 (m, 1H, H-2), 7.10–7.35 (m, 5H, Ph), 8.44 (s, 1H, H-6'), 8.50–8.63 (two d, $J = 7.4$ Hz, each 0.5H, NH of each diastereoisomer), 12.72 (two s, each 0.5H, OH of each diastereoisomer); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 24.5 (C-2''), 25.5 (C-3''), 27.9 (CMe_3), 30.6 (C-4'), 32.4 (C-4''), 34.6 (C-1''), 38.1 (C-3), 54.6 (C-2), 62.6 (C-5''), 79.3 (C-3'), 82.3 (CMe_3), 110.1 (C-8'a), 120.8 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' and C-6'''), 129.5 (C-3''' and C-5'''), 136.2 (C-1'''), 138.9 (C-6'), 140.6 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.4 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{ClNO}_7$ $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$ 476.1471, found 476.1451.



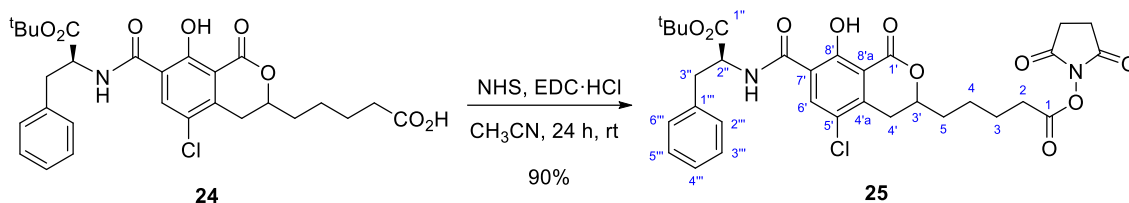
tert-Butyl (5-chloro-8-hydroxy-1-oxo-3-(5-oxopentyl)isochromane-7-carbonyl)-L-phenylalaninate (23). A mixture of Dess-Martin periodinane (DMP) (78.0 mg, 0.18 mmol, 1.5 equiv)

and NaHCO₃ (82 mg, 0.98 mmol, 8.0 equiv) was added to a solution of alcohol **22** (65.0 mg, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) cooled at 0 °C. The resulting mixture was stirred at 0 °C for 10 min and then at rt for 1 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted with EtOAc and washed successively with aqueous solutions of Na₂S₂O₃ (10%), saturated NaHCO₃ and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to dryness at reduced pressure to give aldehyde **23** (59.6 mg, 92%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.42 (s, 9H, CMe₃), 1.48–1.99 (m, 6H, H₂-1'', H₂-2'' and H₂-3''), 2.52 (dt, *J* = 7.0, 1.4 Hz, 2H, H₂-4''), 2.87 (two dd, *J* = 17.3, 11.7 Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.14–3.31 (m, 3H, H'-4' and H₂-3), 4.60 (ddt, *J* = 11.7, 7.7, 4.0 Hz, 1H, H-3'), 4.92–5.01 (dt, *J* = 7.3, 6.1 Hz, 1H, H-2), 7.16–7.32 (m, 5H, Ph), 8.45 (s, 1H, H-6'), 8.56 (two d, *J* = 7.3 Hz, each 0.5H, NH of each diastereoisomer), 9.80 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, CHO), 12.69 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 21.6 (C-2''), 24.3 (C-3''), 27.9 (CMe₃), 30.6 (C-4'), 34.5 (C-1''), 38.1 (C-3), 43.6 (C-4''), 54.6 (C-2), 79.0 (C-3'), 82.3 (CMe₃), 110.1 (C-8'a), 120.9 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' and C-6'''), 129.5 (C-3''' and C-5'''), 136.3 (C-1'''), 139.0 (C-6'), 140.5 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 162.1 (CONH), 169.6 (C-1'), 170.4 (C-1), 201.9 (C-5''); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₂₈H₃₃ClNO₇ [M+H]⁺ 530.1940, found 530.1920.



5-(7-(((S)-1-(tert-Butoxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochroman-3-yl)pentanoic acid (24). A solution of NaH₂PO₄ (92.7 mg, 0.67 mmol, 6.0 equiv) and NaClO₂ (40.5 mg, 0.45 mmol, 4 equiv) in water (620 μL) was added to a solution of aldehyde **23** (59.6 mg, 0.11 mmol) and 2-methylbut-2-ene (175 μL, 1.57 mmol, 14 equiv) in *tert*-BuOH (1.5 mL) and the mixture was stirred at rt for 1 h. Then, a 1 M aqueous solution of HCl (1.5 mL) was added and the mixture was stirred at rt for about 3 min, diluted with EtOAc, washed with brine and concentrated to dryness in vacuo to afford acid **24** (57.7 mg, 94%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.41 (s, 9H, CMe₃), 1.53–2.00 (m, 6H, H₂-3, H₂-4 and H₂-5), 2.42 (t, *J* = 7.10 Hz, 2H, H₂-2), 2.80–2.92 (two dd, *J* = 17.3, 11.9 Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.13–3.31 (m, 3H, H'-4' and H₂-3''), 4.55–4.65 (m, 1H, H-3'), 4.97 (dt, *J* = 7.3, 6.1 Hz, 1H, H-2''), 7.11–7.31 (m, 5H, Ph), 8.46 (s, 1H, H-6'), 8.57–8.62 (m, 1H, NH), 12.70 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 24.2 (C-4), 27.9 (CMe₃), 29.7 (C-3), 30.6 (C-4'), 33.5 (C-2), 34.3 (C-5), 38.1 (C-3''), 54.6 (C-2''), 79.0 (C-3'), 82.4 (CMe₃), 110.1 (C-8'a), 120.9 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' and C-6'''), 129.5 (C-3''' and C-5'''), 136.3 (C-1'''), 139.0

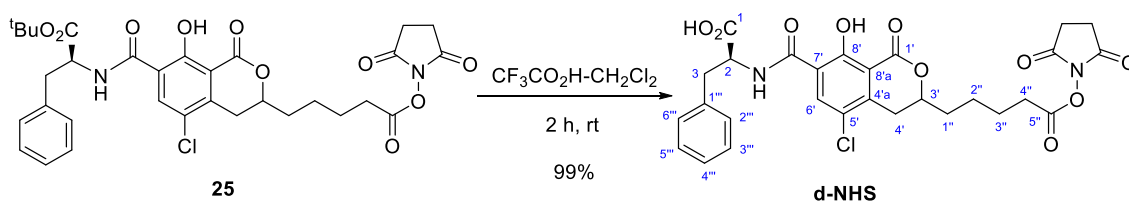
(C-6'), 140.5 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 162.2 (CONH), 169.6 (C-1'), 170.4 (C-1''), 178.0 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₂₈H₃₃ClNO₈ [M+H]⁺ 546.1889, found 546.1867.



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl

5-(7-(((S)-1-(tert-butoxy)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamoyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochroman-3-yl)pentanoate (25).

A solution of acid **24** (31.8 mg, 0.058 mmol), NHS (7.3 mg, 0.064 mmol, 1.1 equiv) and EDC·HCl (13.4 mg, 0.07 mmol, 1.2 equiv) in dry CH₃CN (1.6 mL) was stirred at rt for 24 h under nitrogen, after which it was diluted with EtOAc and washed successively with water, NaHCO₃ (5%) and brine. After drying over anhydrous MgSO₄ and removing the solvent under reduced pressure, the *N*-hydroxysuccinimidyl ester **25** (33.0 mg, 90%) was obtained as an oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.41 (s, 9H, CMe₃), 1.50–1.91 (m, 6H, H₂-3, H₂-4 and H₂-5), 2.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₂-2), 2.83 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.88–2.94 (m, 1H, H-4'), 3.14–3.24 (m, 2H, H₂-3''), 3.27 (dd, *J* = 17.2, 3.3 Hz, H'-4'), 4.54–4.68 (m, 1H, H-3'), 4.90–5.01 (dt, *J* = 7.4, 6.3 Hz, 1H, H-2''), 7.12–7.34 (m, 5H, Ph), 8.44 (s, 1H, H-6'), 8.55 (two dd, *J* = 7.4 Hz, each 0.5H, NH of each diastereoisomer), 12.69 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 24.2 (C-4), 25.6 (COCH₂CH₂CO), 27.9 (CMe₃), 29.7 (C-3), 30.6 (C-2), 30.7 (C-4'), 34.1 (C-5), 38.1 (C-3''), 54.6 (C-2''), 78.9 (C-3'), 82.3 (CMe₃), 110.1 (C-8'a), 120.9 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' and C-6'''), 129.5 (C-3''' and C-5'''), 136.3 (C-1'''), 139.0 (C-6'), 140.5 (C-4'a), 159.1 (C-8'), 162.1 (CONH), 168.3 (C-1), 169.1 (COCH₂CH₂CO), 169.6 (C-1'), 170.4 (C-1''); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₃₂H₃₆ClN₂O₁₀ [M+H]⁺ 643.2053, found 643.2050.

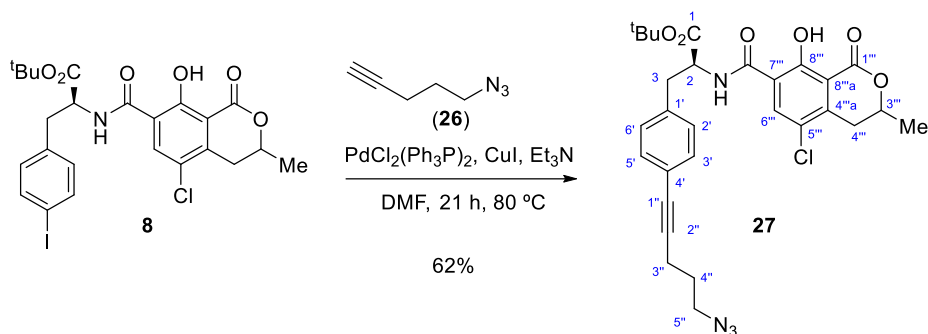


(5-Chloro-3-(5-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-5-oxopentyl)-8-hydroxy-

1-oxoisochromane-7-carbonyl)-L-phenylalanine (d-NHS). A solution of the *tert*-butyl ester **25** (33.0 mg, 0.051 mmol) in CF₃CO₂H (1.5 mL) and anhydrous CH₂Cl₂ (2.3 mL) was stirred at rt for 2 h under nitrogen. The solvents were then removed to dryness under reduced pressure to obtain **d-NHS** (29.8 mg, 99%) as a resinous, brownish-colored residue (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.54–1.93 (m, 6H, H₂-1'', H₂-2'' and H₂-3''), 2.68 (t, *J* = 6.69 Hz, 2H, H₂-4''), 2.85 (br s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.92 (m, 1H, H-4'), 3.17–3.43 (m, 3H, H₂-3 and H'-4'), 4.61

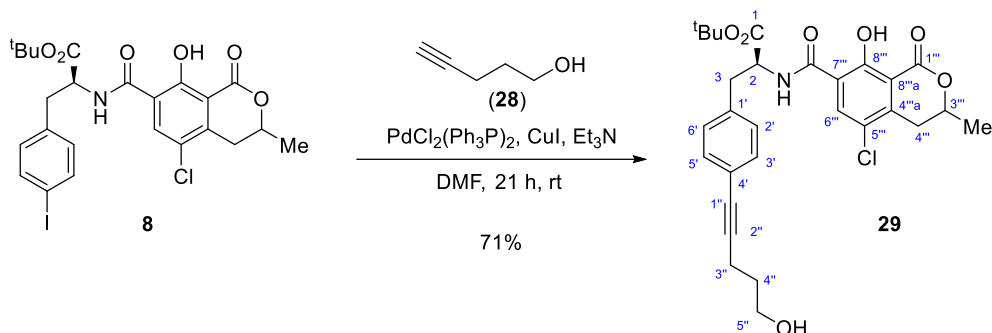
(m, 1H, H-3'), 5.03 (m, 1H, H-2), 7.18–7.33 (m, 5H, Ph), 8.39 (s, 1H, H-6'), 8.56 (br s, 1H, NH), 12.73 (br s, 1H, OH); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm) 24.2 (C-2''), 25.6 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 29.7 (C-3''), 30.6 (C-4''), 30.7 (C-4'), 34.1 (C-1''), 37.2 (C-3), 54.3 (C-2), 79.0 (C-3'), 110.2 (C-8'a), 120.1 (C-7'), 123.3 (C-5'), 127.3 (C-4'''), 128.7 (C-2''' and C-6'''), 129.3 (C-3''' and C-5'''), 135.7 (C-1'''), 138.9 (C-6'), 141.0 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 163.2 (CONH), 168.3 (C-5''), 169.2 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 169.6 (C-1'), 174.1 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{ClN}_2\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 587.1427, found 587.1425.

5.2.6 Synthesis of haptent a

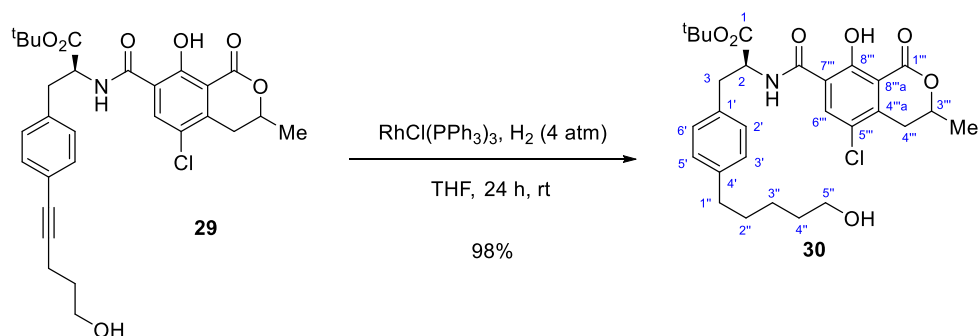


tert-Butyl (2S)-3-(4-(5-azidopent-1-yn-1-yl)phenyl)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)propanoate (27). A mixture of iodinated derivative **8** (20.0 mg, 0.034 mmol), CuI (1.2 mg, $6.12 \cdot 10^{-3}$ mmol, 0.18 equiv), $\text{PdCl}_2(\text{Ph}_3\text{P})_2$ (2.9 mg, $4.08 \cdot 10^{-3}$ mmol, 0.12 equiv) and 5-azidopent-1-yne (**26**, 13.0 mg, 0.119 mmol, 3.5 equiv) was purged by repeated vacuum-nitrogen cycles at 0 °C. Next, anhydrous DMF (2.5 mL) and Et_3N (300 μL , 2.15 mmol, 63 equiv) were added and the mixture was purged again. After stirring at 80 °C for 21 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed successively with aqueous solutions of HCl (1 M), LiCl (1.5%), NaHCO_3 (5%) and brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to give a residue, which after purification by column chromatography using hexane-EtOAc mixtures (90:10, 80:20 and 70:30) as eluent, afforded compound **27** (12.0 mg, 62%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm) 1.43 (two s, each 4.5H, CMe_3 of each diastereoisomer), 1.61 (two d, $J = 6.4$ Hz, each 1.5H, Me-3''' of each diastereoisomer), 1.87 (quin, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₂-4''), 2.53 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₂-3''), 2.81-2.91 (two dd, $J = 17.3, 11.6$ Hz, 1H, H-4''' of each diastereoisomer), 3.20 (m, 2H, H₂-3), 3.30 (dd, $J = 17.3, 3.4$ Hz, 1H, H-4'''), 3.48 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₂-5''), 4.77 (m, 1H, H-3'''), 4.92–4.99 (dt, $J = 7.3, 6.0$ Hz, 1H, H-2), 7.14 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3' and H-5'), 7.31 (m, 2H, H-2' and H-6'), 8.45 (s, 1H, H-6'''), 8.56 (m, 1H, NH), 12.76 (br s, 1H, OH); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm) 16.7 (C-3''), 20.7 (Me-3'''), 27.9 (C-4''), 28.0 (CMe_3), 32.3 (C-4'''), 38.0 (C-3), 50.3 (C-5'''), 54.4 (C-2), 75.8 (C-3'''), 81.5 (C-1'), 82.5 (CMe_3), 88.2 (C-2''), 110.0 (C-8'''a), 120.8 (C-7'''), 122.3 (C-4'), 123.1 (C-5'''), 129.5 (C3' and C-5'), 131.6 (C2' and C-6'), 136.2 (C-1'), 139.0 (C-6'''), 140.6 (C-4'''a), 159.1

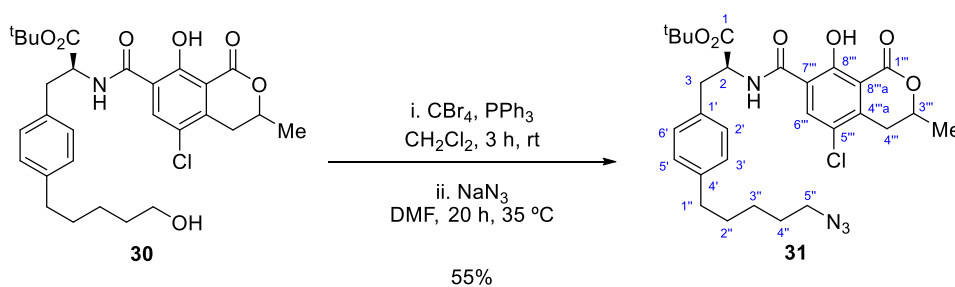
(C-8'''), 162.1 (CONH), 169.8 (C-1'''), 170.2 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₂₉H₃₂ClN₄O₆ [M+H]⁺ 567.2005, found 567.2015.



tert-Butyl (2S)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-(4-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)phenyl)propanoate (29). A mixture of iodinated derivative **8** (155.0 mg, 0.265 mmol), CuI (6 mg, 0.031 mmol, 0.12 equiv), PdCl₂(Ph₃P)₂ (15 mg, 0.021 mmol, 0.08 equiv) and pent-4-yn-1-ol (**28**, 67.0 mg, 0.796 mmol, 3.0 equiv) was purged by repeated vacuum-nitrogen cycles at 0 °C. Next, anhydrous DMF (2.5 mL) and Et₃N (1.3 mL, 8.58 mmol, 32 equiv) were added and the mixture was purged again. After stirring at rt for 21 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed successively with aqueous solutions of HCl (1 M), LiCl (1.5%), NaHCO₃ (5%) and brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give a residue, which after purification by column chromatography using CHCl₃ as eluent, afforded compound **29** (101.8 mg, 71%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.41 (two s, each 4.5H, CMe₃ of each diastereoisomer), 1.58 (two d, *J* = 6.4 Hz, each 1.5H, Me-3'''), 1.83 (quin, *J* = 6.5 Hz, 2H, H₂-4''), 1.94 (br s, 1H, OH), 2.51 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H₂-3''), 2.77–2.91 (m, 1H, H-4'''), 3.18 (m, 2H, H₂-3), 3.27 (dd, *J* = 17.3, 3.5 Hz, 1H, H'-4'''), 3.79 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H₂-5'''), 4.75 (m, 1H, H-3'''), 4.94 (dt, *J* = 7.3, 6.0 Hz, 1H, H-2), 7.12 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3' and H-5'), 7.25–7.31 (m, 2H, H-2' and H-6'), 8.42 (s, 1H, H-6''') 8.54 (two d, *J* = 7.3, each 0.5H, NH of each diastereoisomer) 12.74 (br s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 15.9 (C-3''), 20.6 (Me-3'''), 27.9 (CMe₃), 31.3 (C-4''), 32.2 (C-4'''), 37.9 (C-3), 54.4 (C-2), 61.6 (C-5''), 75.8 (C-3'''), 80.8 (C-1''), 82.5 (CMe₃), 89.4 (C-2''), 109.9 (C-8'''a), 120.7 (C-7'''), 122.3 (C-4'), 123.0 (C-5'''), 129.4 (C3' and C-5'), 131.4 (C2' and C-6'), 135.9 (C-1'), 138.9 (C-6'''), 140.6 (C-4'''a), 159.0 (C-8'''), 162.1 (CONH), 169.7 (C-1'''), 170.1 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₂₉H₃₃ClNO₇ [M+H]⁺ 542.1940, found 542.1936.

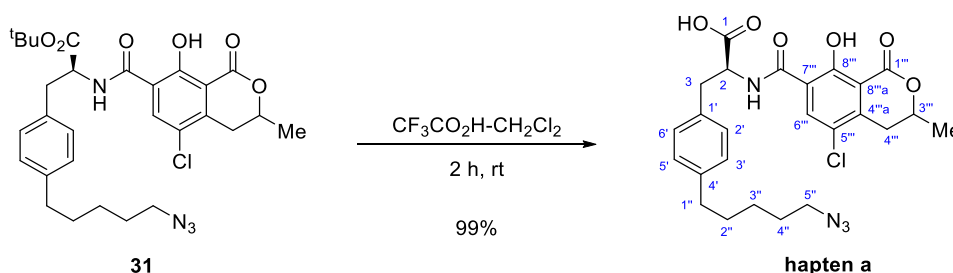


tert-Butyl (2S)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)-3-(4-(5-hydroxypentyl)phenyl)propanoate (30). The alkyne **29** (90.0 mg, 0.166 mmol) and $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ (23.0 mg, 0.025 mmol, 0.15 equiv) in anhydrous THF (4 mL) contained in a Büchi 'Tiny Clave' reactor was purged with hydrogen. The hydrogen pressure was adjusted to 4 atm and stirred for 24 h at rt. After venting, the reaction mixture was concentrated to dryness to obtain a residue which was purified by column chromatography, using CHCl_3 as eluent, to obtain compound **30** (88.7 mg, 98%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 1.36–1.40 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3}''$), 1.42 (s, 9H, CMe_3), 1.60 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-2}''$, $\text{H}_2\text{-4}''$ and $\text{Me-3}'''$), 2.59 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-1}''$), 2.85 and 2.86 (two dd, $J = 17.3, 11.6$ Hz, each 0.5H, $\text{H-4}'''$ of each diastereoisomer), 3.17 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3}$), 3.29 (dd, $J = 17.4, 3.5$ Hz, 1H, $\text{H}'\text{-4}'''$), 3.62 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-5}''$), 4.76 (m, 1H, $\text{H-3}'''$), 4.94 (dt, $J = 7.4, 6.0$ Hz, 1H, H-2), 7.05–7.14 (m, 4H, $\text{H-2}'$, $\text{H-3}'$, $\text{H-5}'$ and $\text{H-6}'$), 8.45 (s, 1H, $\text{H-6}'''$), 8.53 (m, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 20.7 ($\text{Me-3}'''$), 25.3 ($\text{C-3}''$), 27.9 (CMe_3), 31.1 ($\text{C-4}''$), 32.2 ($\text{C-4}'''$), 32.6 ($\text{C-2}''$), 35.4 ($\text{C-1}''$), 37.7 (C-3), 54.6 (C-2), 62.9 ($\text{C-5}''$), 75.9 ($\text{C-3}'''$), 82.2 (CMe_3), 110.0 ($\text{C-8}'''a$), 120.9 ($\text{C-7}'''$), 123.0 ($\text{C-5}'''$), 128.4 ($\text{C-3}'$ and $\text{C-5}'$), 129.4 ($\text{C-2}'$ and $\text{C-6}'$), 133.5 ($\text{C-1}'$), 139.0 ($\text{C-6}'''$), 140.5 ($\text{C-4}'''a$), 141.2 ($\text{C-4}'$), 159.0 ($\text{C-8}'''$), 162.1 (CONH), 169.8 ($\text{C-1}'''$), 170.5 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{ClNO}_7$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 546.2253, found 546.2245.



tert-Butyl (2S)-3-(4-(5-azidopentyl)phenyl)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)propanoate (31). A solution of PPh_3 (73.3 mg, 0.275 mmol, 1.6 equiv) in anhydrous CH_2Cl_2 (1 mL) was added to a solution of the alcohol **30** (94.4 mg, 0.173 mmol) and CBr_4 (120.8 mg, 0.361 mmol, 2.1 equiv) at 0 °C under N_2 . The reaction mixture was stirred at rt for 3 h, after which it was diluted with DCM and washed successively with water and brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to give

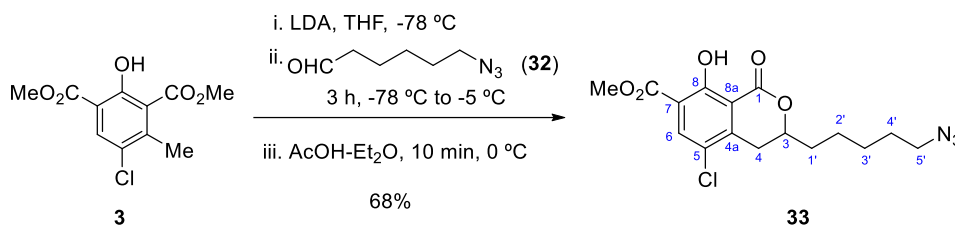
a residue, which was purified by column chromatography, using hexane-EtOAc mixtures (100:0, 95:5 and 80:20) as eluent, to obtain the corresponding bromide derivative (54.8 mg, 55%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). A solution of this bromide intermediate (54.8 mg, 0.09mmol) and NaN_3 (97.5 mg, 1.5 mmol, 16.7 equiv.) in anhydrous DMF (2 mL) was stirred overnight at 35 °C under N_2 , afterwards it was diluted with EtOAc and washed with an aqueous solution of LiCl (1.5%) and brine. The organic phase was dried over anhydrous MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to obtain azide **31** (51 mg, 100%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 1.36–1.40 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3}''$), 1.42 (s, 9H, CMe_3), 1.58–1.68 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-2}''$, $\text{H}_2\text{-4}''$ and $\text{Me-3}'''$), 2.59 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-1}''$), 2.85 and 2.86 (two dd, $J = 17.4, 11.6$ Hz, each 0.5H, $\text{H-4}'''$ of each diastereoisomer), 3.17 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3}$), 3.22–3.34 (m, 3H, $\text{H}_2\text{-5}''$ and $\text{H-4}'''$), 4.76 (m, 1H, $\text{H-3}'''$), 4.94 (dt, $J = 7.4, 6.0$ Hz, 1H, H-2), 7.05–7.14 (m, 4H, $\text{H-2}'$, $\text{H-3}'$, $\text{H-5}'$ and $\text{H-6}'$), 8.45 (s, 1H, $\text{H-6}'''$), 8.54 (m, 1H, NH), 12.71 (br s, 1H, OH); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 20.7 ($\text{Me-3}'''$), 26.3 ($\text{C-3}''$), 27.9 (CMe_3), 28.7 ($\text{C-4}''$), 30.9 ($\text{C-2}''$), 32.3 ($\text{C-4}'''$), 35.3 ($\text{C-1}''$), 37.7 (C-3), 51.4 ($\text{C-5}''$), 54.6 (C-2), 75.8 ($\text{C-3}'''$), 82.2 (CMe_3), 110.0 ($\text{C-8}'''a$), 120.9 ($\text{C-7}'''$), 123.0 ($\text{C-5}'''$), 128.3 ($\text{C-3}'$ and $\text{C-5}'$), 129.5 ($\text{C-2}'$ and $\text{C-6}'$), 133.6 ($\text{C-1}'$), 139.0 ($\text{C-6}'''$), 140.5 ($\text{C-4}'''a$), 140.9 ($\text{C-4}'$), 159.1 ($\text{C-8}'''$), 162.1 (CONH), 169.7 ($\text{C-1}'''$), 170.4 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{ClN}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 571.2318, found 571.2300.



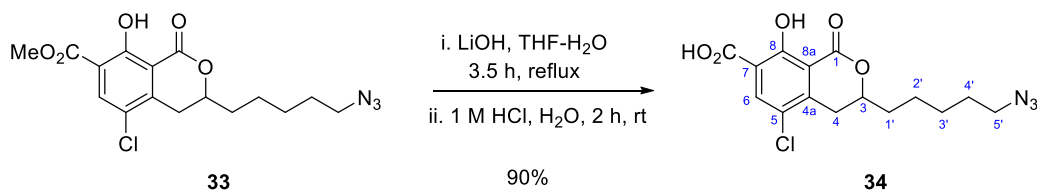
(2S)-3-(4-(5-Azidopentyl)phenyl)-2-(5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxoisochromane-7-carboxamido)propanoic acid (hapten a). Trifluoroacetic acid (600 μL , 7.8 mmol) was dropwise added to a solution of *tert*-butyl ester **31** (45 mg, 0.078 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (1.2 mL) and the resulting mixture was stirred for 2 h at rt. Afterwards, the reaction mixture was concentrated to dryness to afford hapten **a** (40.5 mg, nearly quantitative) as a resinous and yellowish product (a 1:1 mixture of diastereoisomers). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 1.35–1.44 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3}''$), 1.54–1.67 (m, 7H, $\text{H}_2\text{-2}''$, $\text{H}_2\text{-4}''$ and $\text{Me-3}'''$), 2.58 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-1}''$), 2.83 and 2.84 (two dd, $J = 17.0, 11.3$ Hz, each 0.5H, $\text{H-4}'''$ of each diastereoisomer), 3.12–3.34 (m, 5H, $\text{H}_2\text{-3}$, $\text{H}_2\text{-5}''$ and $\text{H-4}'''$), 4.74 (m, 1H, $\text{H-3}'''$), 4.97 (m, 1H, H-2), 7.08–7.16 (m, 4H, $\text{H-2}'$, $\text{H-3}'$, $\text{H-5}'$ and $\text{H-6}'$), 8.39 (s, 1H, $\text{H-6}'''$), 8.47 (m, 1H, NH) 12.71 (br s, 1H, OH); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 20.6 ($\text{Me-3}'''$), 26.3 ($\text{C-3}''$), 28.6 ($\text{C-4}''$), 30.8 ($\text{C-2}''$), 32.2 ($\text{C-4}'''$), 35.3 ($\text{C-1}''$), 37.0 (C-3), 51.3 ($\text{C-5}''$), 54.3 (C-2), 75.8 ($\text{C-3}'''$), 109.9 ($\text{C-8}'''a$), 120.6 ($\text{C-7}'''$), 123.0 ($\text{C-5}'''$), 128.4 ($\text{C-3}'$ and $\text{C-5}'$), 129.4 ($\text{C-2}'$ and $\text{C-6}'$),

133.5 (C-1'), 138.9 (C-6'''), 140.6 (C-4'''), 140.9 (C-4'), 159.0 (C-8'''), 162.6 (CONH), 169.7 (C-1'''), 173.5 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₂₅H₂₈ClN₄O₆ [M+H]⁺ 515.1692, found 515.1686.

5.2.7 Synthesis of hapten **c**

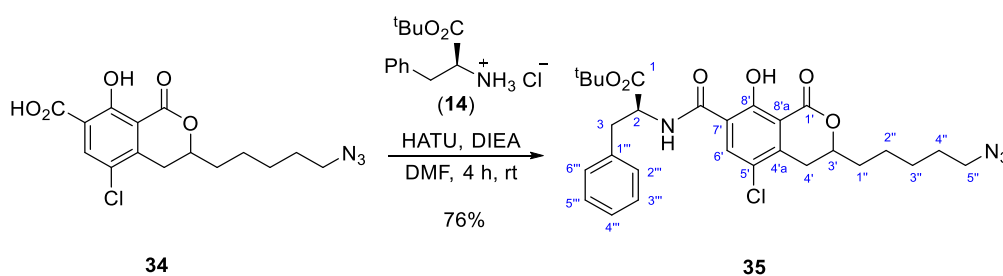


Methyl 3-(5-azidopentyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochroman-7-carboxylate (33). A solution of diester **3** (366.0 mg, 1.42 mmol) in anhydrous THF (1.5 mL) was added dropwise to a solution of LDA in THF [generated from diisopropylamine (580 μ L, 3.9 mmol, 2.75 equiv) and 1.6 M BuLi in hexane (2.2 mL, 3.55 mmol, 2.5 equiv) in THF (4 mL)] at -78 °C under nitrogen. The mixture was maintained at the same temperature for 30 min and then a solution of aldehyde **32** (320 mg, 2.2 mmol, 1.6 equiv) in anhydrous THF (500 μ L) was added. After stirring at -78 °C for 15 min and warming slowly to 5 °C (about 3 hours), the reaction mixture was treated with a 1:2 mixture of AcOH-Et₂O and stirred for 10 minutes at 0 °C. Afterwards, the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with water and brine and dried over anhydrous MgSO₄. Chromatographic purification of the residue obtained by evaporation of the solvent under reduced pressure, using hexane-EtOAc-AcOH mixtures (100:0:0.3, 95:5:0.3 and 85:15:0.3) as eluent afforded compound **33** (356.0 mg, 68%) as a yellowish oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.35–2.00 (m, 8H, H₂-1', H₂-2', H₂-3' and H₂-4'), 2.85 (dd, $J = 17.3, 11.7$ Hz, 1H, H-4), 3.24 (dd, $J = 17.3, 3.2$ Hz, 1H, H'-4), 3.30 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₂-5'), 3.94 (s, 3H, OMe), 4.56 (m, 1H, H-3), 8.09 (s, 1H, H-6), 12.16 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 24.3 (C-2'), 26.4 (C-3'), 28.6 (C-4'), 31.0 (C-4), 34.5 (C-1'), 51.2 (C-5'), 52.6 (OMe), 78.4 (C-3), 111.4 (C-8a), 118.3 (C-7), 121.8 (C-5), 138.0 (C-6), 142.2 (C-4a), 161.1 (C-8), 165.0 (C-1), 167.7 (CO₂); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₁₆H₁₉ClN₃O₅ [M+H]⁺ 368.1008, found 368.1020.



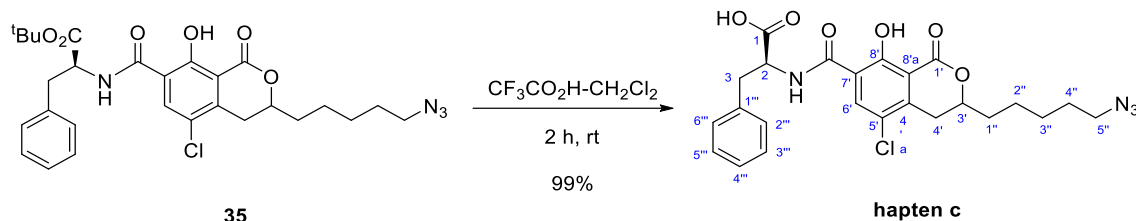
3-(5-Azidopentyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochroman-7-carboxylic acid (34). A solution of LiOH-H₂O (398.0 mg, 9.5 mmol, 10 equiv) in water (4.0 mL) was added to a solution of dihydroisocoumarin **33** (350.0 mg, 0.95 mmol) in anhydrous THF (3.5 mL) and the mixture was refluxed for 3.5 h. Afterwards, the reaction mixture was cooled in an ice bath, treated with a 1 M

aqueous solution of HCl (17 mL, 17.1 mmol, 18 equiv), stirred for 2 h at r.t., diluted with water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to dryness under reduced pressure to obtain acid **34** (301.0 mg, 90%) as a yellowish semi-solid whose ¹H NMR spectrum showed to have a sufficiently high purity to be used in the next stage without further purification. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.43–1.76 (m, 6H, H₂-1', H₂-2' and H₂-3'), 1.78–2.05 (m, 2H, H₂-4'), 2.93 (dd, *J* = 17.7, 11.7 Hz, 1H, H-4), 3.27–3.36 (m, 3H, H₂-5' and H'-4), 4.62–4.72 (m, 1H, H-3), 8.40 (s, 1H, H-6), 13.21 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 24.3 (C-2'), 26.4 (C-3'), 28.7 (C-4'), 30.7 (C-4), 34.5 (C-1'), 51.2 (C-5'), 79.5 (C-3), 110.6 (C-8a), 117.3 (C-7), 124.0 (C-5), 139.8 (C-6), 143.0 (C-4a), 159.2 (C-8), 163.5 (C-1), 169.3 (CO₂H); HRMS (TOF ESI+) calcd for C₁₅H₁₇ClN₃O₅ [M+H]⁺ 354.0851, found 354.0841.



tert-Butyl (3-(5-azidopentyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochromane-7-carboxyl)-L-phenylalaninate (35). A solution of HATU (482.0 mg, 1.27 mmol, 1.5 equiv) in anhydrous DMF (3 mL) and DIEA (295 μL, 1.7 mmol, 2 equiv) was added to a solution of acid **34** (300.0 mg, 0.85 mmol) in anhydrous DMF (3 mL) under nitrogen and the resulting mixture was stirred at rt for 2 h. Next, a solution of hydrochloride **14** (416.0 mg, 1.70 mmol, 2 equiv) and DIEA (295 μL, 1.7 mmol, 2 equiv) in anhydrous DMF (3 mL) was added and the mixture was stirred at rt for 4 h. The reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with aqueous solutions of HCl (1 M), LiCl (1.5%), NaHCO₃ (5%) and brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue obtained was purified by chromatography on silica gel, using hexane-EtOAc-AcOH mixtures (100:0:0.3 and 90:10:0.3) as eluent to obtain amide **35** (359.0 mg, 76%) as a yellowish oil (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.37–1.95 (m, 8H, H₂-1'', H₂-2'', H₂-3'' and H₂-4''), 1.42 (s, 9H, CMe₃), 2.86 and 2.88 (two dd, *J* = 17.3, 11.7 Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.18–3.25 (m, 3H, H'-4' and H₂-3), 3.31 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H₂-5''), 4.54–4.67 (m, 1H, H-3'), 4.97 (dt, *J* = 7.3, 6.0 Hz, 1H, H-2), 7.19–7.34 (m, 5H, Ph), 8.46 (s, 1H, H-6'), 8.55 and 8.56 (two br d, *J* = 7.2, each 0.5H, NH of each diastereoisomer); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 24.3 (C-2''), 26.4 (C-3''), 27.9 (CMe₃), 28.7 (C-4''), 30.6 (C-4'), 34.6 (C-1''), 38.1 (C-3), 51.2 (C-5''), 54.6 (C-2), 79.1 (C-3'), 82.3 (CMe₃), 110.1 (C-8'a), 120.9 (C-7'), 123.1 (C-5'), 126.9 (C-4'''), 128.3 (C-2''' and C-6'''), 129.5 (C-3''' and C-5'''), 136.3 (C-1'''), 139.0 (C-6'), 140.5 (C-4'a), 159.0 (C-8'),

162.1 (CONH), 169.7 (C-1'), 170.4 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₂₈H₃₄ClN₄O₆ [M+H]⁺ 557.2161, found 557.2162.

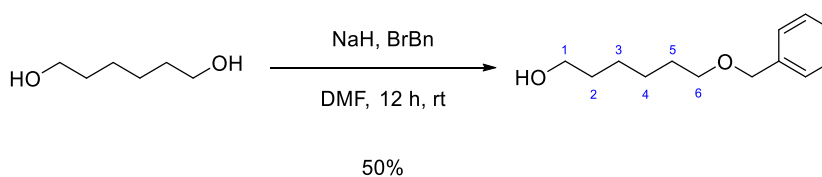


(3-(5-Azidopentyl)-5-chloro-8-hydroxy-1-oxoisochromane-7-carbonyl)-L-phenylalanine

(hapten c). Trifluoroacetic acid (4.0 mL, 52.0 mmol) was dropwise added to a solution of *tert*-butyl ester **35** (279.0 mg, 0.50 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (8.0 mL) and the resulting mixture was stirred for 2 h at rt. Afterwards, the reaction mixture was concentrated to dryness to afford hapten **c** (249.8 mg, nearly quantitative) as a resinous and yellowish product (a 1:1 mixture of diastereoisomers). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.42–2.00 (m, 8H, H₂-1'', H₂-2'', H₂-3'' and H₂-4''), 2.86 and 2.88 (two dd, *J* = 17.5, 11.7 Hz, each 0.5H, H-4' of each diastereoisomer), 3.15–3.40 (m, 5H, H₂-3, H'-4' and H₂-5''), 4.60 (m, 1H, H-3'), 5.03 (m, 1H, H-2), 7.15–7.37 (m, 5H, Ph), 8.42 (s, 1H, H-6'), 8.49 and 8.50 (two br d, *J* = 7.1, each 0.5H, NH of each diastereoisomer), 12.72 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 24.3 (C-2''), 26.4 (C-3''), 28.6 (C-4''), 30.6 (C-4'), 34.5 (C-1''), 37.3 (C-3), 51.2 (C-5''), 54.3 (C-2), 79.2 (C-3'), 110.2 (C-8'a), 120.1 (C-7'), 123.2 (C-5'), 127.2 (C-4'''), 128.6 (C-2''' and C-6'''), 129.3 (C-3''' and C-5'''), 135.7 (C-1'''), 138.8 (C-6'), 141.0 (C-4'a), 159.0 (C-8'), 163.0 (CONH), 169.6 (C-1'), 175.1 (C-1); **HRMS** (TOF ESI+) calcd for C₂₄H₂₆ClN₄O₆ [M+H]⁺ 501.1535, found 501.1522.

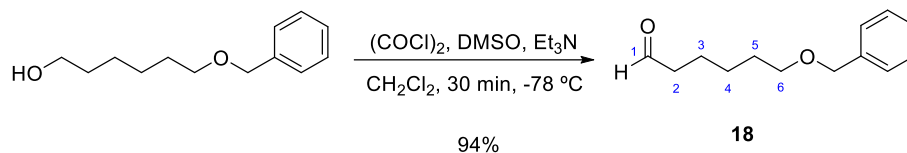
5.2.8 Synthesis of spacer arms

Aldehyde (**18**)²¹⁸



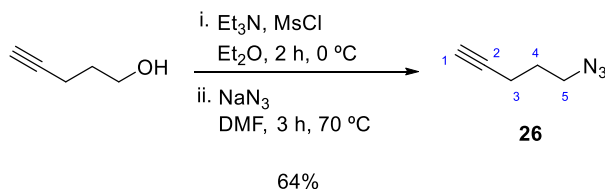
6-(Benzyloxy)hexan-1-ol. A solution of hexane-1,6-diol (2.0 g, 16.9 mmol) in anhydrous DMF (5 mL) was added dropwise to a suspension of NaH (60% in mineral oil, 777 mg, 19.4 mmol, 1.2 equiv) in DMF (15 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h and then a solution of benzyl bromide (2.9 g, 16.9 mmol, 1.0 equiv) in DMF (5 mL) was added. After stirring for 12 h at rt, the excess of NaH was quenched with a saturated solution of NH₄Cl and the mixture was diluted with Et₂O. The organic phase was washed with water, LiCl (1.5%), brine, dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give a residue, which after purification by

column chromatography using hexane-EtOAc mixtures (95:5 and 90:10) as eluent, afforded 6-(benzyloxy)hexan-1-ol (1.78 g, 50%) as a colourless oil. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 1.23–1.41 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-3}$ and $\text{H}_2\text{-4}$), 1.42–1.52 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-2}$), 1.53–1.64 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-5}$), 3.41 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-6}$) 3.51 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-1}$) 4.44 (s, 2H, OCH_2Ph) 7.14–7.35 (m, 5H, Ph).



6-(Benzyloxy)hexanal (18). DMSO (510 μL , 7.2 mmol, 3.0 equiv) was added to a stirred solution of oxalyl chloride (300 μL , 3.6 mmol, 1.5 equiv) in CH_2Cl_2 (10 mL) at -78 °C. The reaction mixture was stirred for 45 min, and then a solution of 6-(benzyloxy)hexan-1-ol (500 mg, 2.4 mmol) in CH_2Cl_2 (4 mL) was added. After stirring at -78 °C for 1 h, the reaction was quenched by the addition of Et_3N (1.7 mL, 12.0 mmol, 5 equiv). After 30 min, water (15 mL) was added and the organic layer was separated and the aqueous phase extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with HCl (1 M) and brine, dried with anhydrous MgSO_4 and concentrated to give the corresponding 6-(benzyloxy)hexanal (**18**, 467.0 mg, 94%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 1.27–1.44 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-4}$), 1.49–1.67 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-3}$ and $\text{H}_2\text{-5}$), 2.36 (td, $J = 7.4, 1.7$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-2}$), 3.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-6}$), 4.44 (s, 2H, OCH_2Ph), 7.16–7.35 (m, 5H, Ph), 9.68 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, CHO).

Alkyne (**26**)²¹⁹

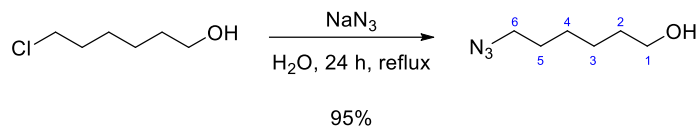


5-Azidopent-1-yne (26). Methanesulfonylchloride (1.1 mL, 14.3 mmol, 1.2 equiv) was added dropwise to a stirred solution of 4-pentyn-1-ol (1.0 g, 11.9 mmol) and Et_3N (2.1 mL, 14.9 mmol, 1.3 equiv) in anhydrous diethyl ether (15 mL) at 0 °C under N_2 atmosphere. After 2 h, water was added to the reaction mixture. The organic layer was separated, washed with brine, dried over anhydrous MgSO_4 and evaporated to yield pent-4-yn-1-yl methanesulfonate (1.7 g, 87%) as a pale yellow liquid. Sodium azide (1.7 g, 25.8 mmol, 2.5 equiv) was added to a solution of the intermediate mesylate (1.7 g, 10.3 mmol) in dry DMF (7 mL) under N_2 . After stirring at 70 °C for 3 h, the reaction mixture was washed with water, LiCl (1.5%) and brine, then dried over anhydrous MgSO_4 and evaporated to yield alkyne **26** (0.83 g, 74%) as a pale yellow liquid. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300

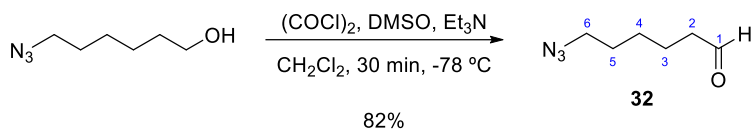
EXPERIMENTAL PROCEDURES

MHz) δ (ppm) 1.75 (quin, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₂₋₄), 1.97 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-1), 2.27 (td, $J = 6.9, 2.7$ Hz, 2H, H₂₋₃), 3.38 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H₂₋₅).

Aldehyde (**32**)^{224,225}

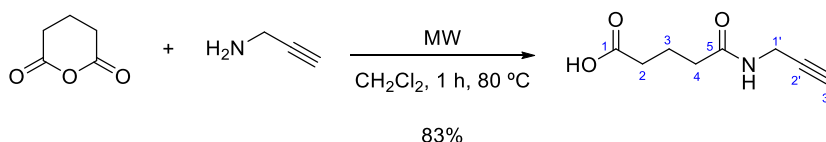


6-Azido-1-hexanol. A suspension of 6-chlorohexan-1-ol (5.0 g, 0.037 mmol) and sodium azide (6.45 g, 0.099 mmol, 2.7 equiv) in water (40 mL) was refluxed for 24 h. The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ and the reunited organic phases were washed with brine and dried over anhydrous MgSO₄ to obtain, after solvent removal, 6-azido-1-hexanol (5.1 g, 95%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.31–1.46 (m, 4H, H₂₋₃ and H₂₋₄), 1.48–1.68 (m, 4H, H₂₋₂ and H₂₋₅), 3.26 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H₂₋₆), 3.64 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, H₂₋₁).



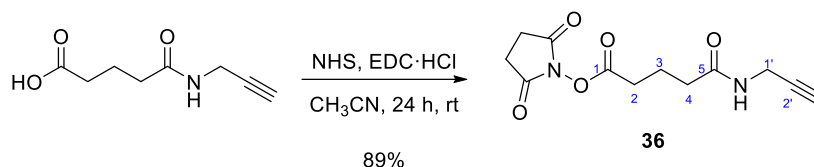
6-Azido-1-hexanal (32**).** DMSO (600 μ L, 8.4 mmol, 3.0 equiv) was added to a stirred solution of oxalyl chloride (354 μ L, 4.19 mmol, 1.5 equiv) in CH₂Cl₂ (10 mL) at -78 °C. The reaction mixture was stirred for 45 min, and then a solution of 6-azido-1-hexanol (400 mg, 2.79 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) was added. After stirring at -78 °C for 1 h, the reaction was quenched by the addition of Et₃N (2 mL, 14.0 mmol, 5 equiv) while the reaction mixture was at -78 °C. After 30 min, water (20 mL) was added, the organic layer was separated and the aqueous phase extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with HCl (1 M) and brine, dried with anhydrous MgSO₄ and concentrated to give the corresponding 6-azido-1-hexanal (**32**, 322.6 mg, 82%). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1.34–1.49 (m, 2H, H₂₋₄), 1.54–1.75 (m, 4H, H₂₋₃ and H₂₋₅), 2.44 (dt, $J = 7.2, 1.7$ Hz, 2H, H₂₋₂), 3.28 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H₂₋₆), 9.8 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, CHO).

Alkyne for protein modification (**36**)²³⁰



5-Oxo-5-(prop-2-yn-1-ylamino)pentanoic acid. Propargylamine (608.0 mg, 11.0 mmol, 2.1 equiv) was added dropwise to a solution of glutaric anhydride (600 mg, 5.26 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL). The resulting mixture was stirred under microwave conditions for 1 h at 80 °C. After removing the solvent under reduced pressure, the reaction mixture was dissolved in brine and

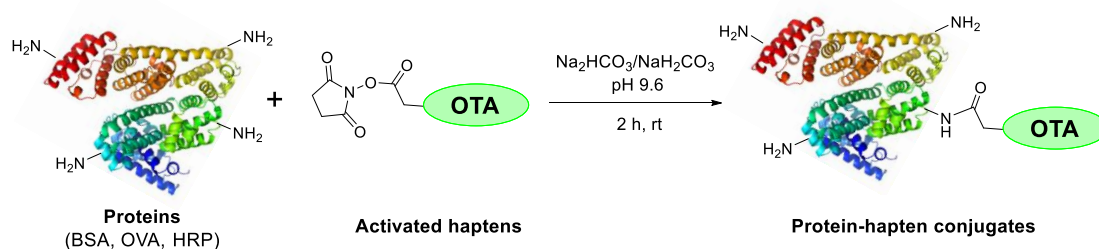
acidified with concentrated HCl. Afterwards, the aqueous phase was extracted with EtOAc and the reunited organic phases were dried over anhydrous MgSO_4 to obtain, after solvent removal, 5-oxo-5-(prop-2-yn-1-ylamino)pentanoic acid (739.0 mg, 83%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (MeOD, 300 MHz) δ (ppm) 1.89 (quin, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-3}$), 2.25 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-2}$), 2.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-4}$), 2.56 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, $\text{H-3}'$), 3.94 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-1}'$).



2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 5-oxo-5-(prop-2-yn-1-ylamino)pentanoate (36). A solution of EDC·HCl (202.6 mg, 1.06 mmol, 1.2 equiv) in anhydrous CH_3CN (4 mL) was added dropwise to a solution of 5-oxo-5-(prop-2-yn-1-ylamino)pentanoic acid (150 mg, 0.89 mmol) and NHS (112.2 mg, 0.98 mmol, 1.1 equiv) in CH_3CN (4.5 mL) under nitrogen. The reaction mixture was stirred at rt for 24 h and then diluted with EtOAc and washed successively with water, NaHCO_3 (5%) and brine. After drying over anhydrous MgSO_4 , evaporation of the solvent under reduced pressure gave the *N*-hydroxysuccinimidyl ester of 5-oxo-5-(prop-2-yn-1-ylamino)pentanoic acid (**36**) (210.0 mg, 89%) as a white solid. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 2.11 (quin, $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-3}$), 2.22 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H, $\text{H-3}'$), 2.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-4}$), 2.69 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-2}$), 2.86 (br s, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 4.04 (dd, $J = 5.4, 2.5$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{-1}'$), 6.24 (br s, 1H, NH).

5.3 Preparation of protein–hapten conjugates

5.3.1 Conjugation of carboxylate-based haptens



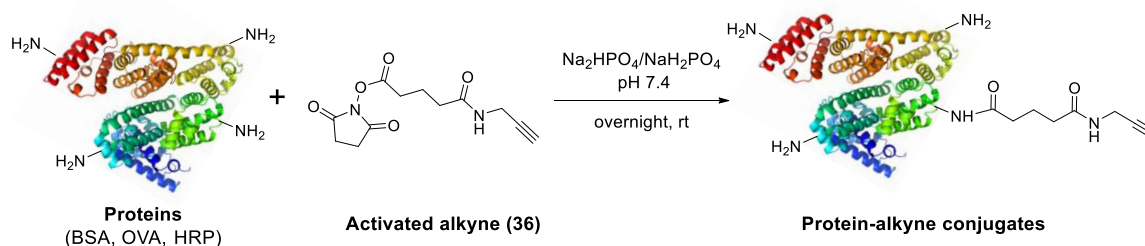
Preparation and purification of carboxylated-haptens conjugates. Each of the active esters of OTA haptens was dissolved in DMF and added dropwise to a protein solution in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6). After stirring for 2 h at rt, the protein conjugates were purified by size-exclusion chromatography using PB buffer as eluent at 5 mL/min flow rate and collecting 1-mL fractions.

Table 5.1. Conditions for the preparation of carboxylate-based protein-hapten conjugates.

Conjugate	Protein			Hapten			RM ₀
	V (μL)	C (mg/mL)	n (μmol)	V (μL)	C (mM)	n (μmol)	
BSA-Hapten	1800	15.0	0.41	200	50	10.0	24
OVA-Hapten	1900	15.0	0.64	100	50	5.0	8
HRP-Hapten	900	2.5	0.05	80	5	0.4	8

5.3.2 Conjugation of azide-based haptens

5.3.2.1 Preparation of alkyne-modified proteins

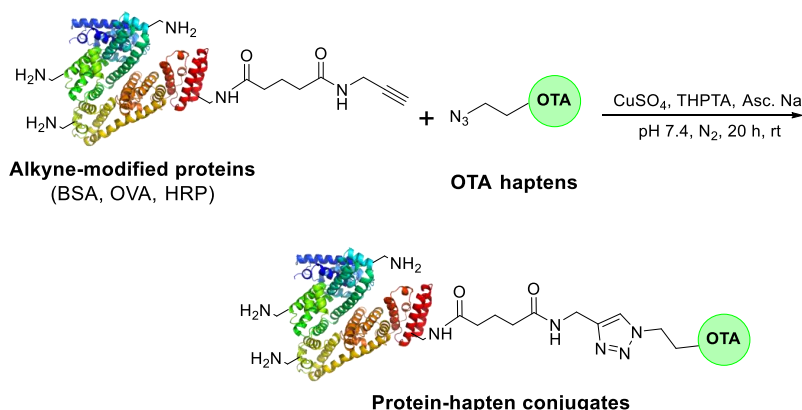


Modification and purification of protein-alkyne conjugates. Alkyne **36** was dissolved in DMF and added dropwise to a protein solution in PB buffer. After overnight stirring at rt, the protein conjugates were purified by size-exclusion chromatography using PB buffer as eluent at 5 mL/min flow rate and collecting 1-mL fractions.

Table 5.2. Conditions for the preparation of alkyne-modified proteins at different molar ratios.

Conjugate	Protein			Alkyne			RM ₀
	V (μL)	C (mg/mL)	n (μmol)	V (μL)	C (mM)	n (μmol)	
BSA-alkyne	1800	11.1	0.30	30	250	7.6	25
OVA-alkyne	1800	15	0.61	100	75	7.5	12
HRP-alkyne	1700	3	0.12	80	15	1.2	10

5.3.2.2 CuAAC reaction



Cu(I)-catalysed cycloaddition (CuAAC): Solutions of haptens **a** or **c** in DMSO and THPTA/Cu(I) (5:1) complex in MiliQ H₂O were added to an alkyne-modified protein solution in PB

buffer. After adjusting the final volume with the same buffer, the mixture was purged by repeated vacuum-nitrogen cycles. Finally, a solution of sodium ascorbate in MilliQ H₂O was added and the mixture was incubated for 20 h at rt. The reaction was stopped using Amicon® Ultra 4 10K centrifugal filters and the protein conjugates were purified by size-exclusion chromatography using PB buffer as eluent at 5 mL/min flow rate and collecting 1-mL fractions.

Table 5.3. CuAAC conditions for each of the alkyne-modified proteins.

Conjugate	Protein				CuAAC Reagents								V _{final} (mL) ^g
	N ^o		m (mg) ^c	n _{alkyne} (μmol) ^d	Azide		CuSO ₄		THPTA		Asc. Na		
	Alkyne ^a	MW ^b			C ^e	Equiv ^f	C	Equiv	C	Equiv	C	Equiv	
BSA-Alkyne	17	68.5	12	3.06	20	6	45	0.4	115	2	100	20	30
OVA-Alkyne	7	46.1	5	0.77	10	2	45	0.2	115	1	100	10	8
HRP-Alkyne	1	44.1	1	0.02	10	4	4.5	0.2	1.2	1	10	10	1

^a Number of alkyne residues per protein. ^b Estimated molecular weight of the alkyne-modified proteins by MALDI-TOF analysis (kDa). ^c Mass of alkyne-modified protein employed in the CuAAC reaction. ^d Mol of alkyne present during the CuAAC reaction. ^e Concentration of freshly prepared solutions (mM). ^f Mol of reagent per mol of alkyne present in the protein. ^g Final reaction volume.

5.3.3 Storage and conjugate characterization

BSA conjugates. The chromatographic fractions containing conjugate were gathered and sterilised using 0.45 μm sterile filters. The final conjugate concentration was adjusted to 1 mg/mL using PB buffer, assuming there was no loss of protein during the purification process. After acquiring the absorption UV/Vis spectrum, solutions were stored at -20 °C.

OVA conjugates. The chromatographic fractions containing conjugate were reunited and the final conjugate concentration was adjusted to 1 mg/mL using PB buffer, with 0.01% (m/v) thimerosal. After acquiring the absorption UV/Vis spectrum, solutions were stored at -20 °C.

HRP conjugates. The chromatographic fractions containing enzymatic conjugate were reunited and the UV-Vis spectrum was acquired. The conjugate concentration was calculated using the absorbance value at 400 nm assuming that the hapten contribution in this wavelength was negligible. Molar extinction coefficient (65.38 mM/cm) at 400 nm was calculated using solutions in PB buffer of the non-modified protein. The final solution was diluted 2-fold with PBS-BSA-thimerosal and stored at 4 °C.

MALDI mass spectrometry analysis. 100 μL of each of the protein conjugate solution (0.5–1 mg/mL) were dialysed against MilliQ water. Then, 1 μL of every sample was spotted onto the MALDI plate. After the droplets were air dried at rt, 1 μL of matrix (5 mg/mL sinapinic acid in 0.1% trifluoroacetic acid-CH₃CN/H₂O (7:3 v/v)) was added and allowed to air-dry at rt. The resulting mixtures were analysed in positive linear mode (1500 shots every position) in a mass range of 10000–120000 m/z. The plate was calibrated with 1 μL of the calibration mixture in 13 positions.

Every sample was calibrated by 'close external calibration' method with a BSA, OVA, or HRP spectrum acquired in a close position. Hapten-to-protein ratios were calculated from the difference in the m/z of the conjugates $[(m/z)_C]$ and the reference proteins $[(m/z)_P]$, and the results were divided by the expected increase per hapten molecule $[\Delta(m/z)]$ according to equation 5.1.

$$RM = \frac{(m/z)_C - (m/z)_P}{\Delta(m/z)} \quad \text{Equation 5.1}$$

5.4 Generation of polyclonal antibodies

Twelve 2-kg female New Zealand white rabbits were employed, two for each BSA-hapten conjugate.

Immunization process. Each immunization dose consisted of 300 μ g of BSA-hapten conjugate in 1 mL of a 1:1 emulsion between sterile PB buffer and Freund's adjuvant (complete for the first dose and incomplete for subsequent boosts). Four injections at 21-day intervals were subcutaneously applied in the dorsal area of the animals. Ten days after the fourth injection, rabbits were exsanguinated, obtaining the blood from the ear veins.

Purification of polyclonal antibodies. Blood samples were allowed to coagulate overnight at 4 °C, and sera were separated by double centrifugation (3000 \times g, 20 min). Antibodies were precipitated with 1 volume of SAS, and after removing the supernatant obtained after centrifugation (3000 \times g, 20 min), precipitates were dissolved in PBS and precipitated again with 1 volume of SAS. An aliquot of the homogenised suspension was 1:1 diluted with PBS-BSA-thimerosal as working solution. All samples were stored at 4 °C.

In order to assess the evolution of the immune response, after the third immunization, this procedure was applied to obtain 5–10 mL of blood samples from the ear vein. After double centrifugation for the removal of coagulates, supernatants were directly diluted 1:1 (v/v) with PBS-BSA-thimerosal.

5.5 Generation of monoclonal antibodies

5.5.1 Immunization of mice

Four two-month old female Balb/c mice were immunised with each hapten by intraperitoneal injection of 100 μ g of conjugate in 200 μ L of a water-in-oil emulsion prepared using Freund's adjuvants as described above for rabbit immunization. Three doses were applied at

21-day intervals, and a fourth injection in sterile PBS with the same amount of protein conjugate was given at least 21 days after the third injection and 4 days before the animal was sacrificed.

In order to assess the evolution of the immune response, after the third immunization, blood samples obtained by submandibular puncture were allowed to coagulate overnight at 4 °C and sera were separated by double centrifugation (9660xg, 15 min). Supernatants were 1/5 diluted with PBS-BSA-thimerosal and stored at 4 °C. This procedure was also applied to the blood samples obtained by intracardiac puncture after animal sacrifice.

5.5.2 Hybridoma generation

Hybridomas were generated by cellular fusion of myeloma cell line P3-X63-Ag8.653²⁵⁰ with B lymphocytes extracted from the spleen of two equally-immunised mice following a protocol adapted from the original procedure developed by Köhler and Milstein.^{130,251}

Isolation of myelomas and lymphocytes. After mice sacrifice, blood was obtained by intracardiac puncture and spleens were extirpated. Cells were physically extracted from the spleen in complete medium using the piston of a sterile syringe, and erythrocytes were lysed by osmotic shock employing 1 mL of lysis buffer at 4 °C for 1 min. After washing the obtained lymphocytes with complete medium at 4 °C, the suspension was filtered to eliminate possible blood clots.

Cellular fusion and hybridoma culture. Myeloma cells cultured in complete medium were mixed with the B lymphocytes at a 4:1 lymphocyte/myeloma ratio, and the cell mixture was washed three times with incomplete medium. After collecting cells by centrifugation, 1 mL of PEG 1500 pre-warmed at 37 °C was added for 1 min; the cell mixture was suspended in 50 mL of complete medium and incubated for 30 min. Afterwards, cells were collected by centrifugation, suspended in post-fusion medium and cultured in 96-well plates (100 µL per well, 1.5-2.0·10⁵ cells per well). After incubating the plates for 24 h at 37 °C (5% CO₂, 95% RH), 100 µL per well of HAT medium were added and the plates were incubated for 10-12 days under the same conditions.

Hybridoma selection. Hybridoma culture supernatants were first screened by differential competitive ELISA¹³² on plates coated with 0.1 µg/mL (100 µL per well) of the homologous OVA–haptan conjugate. Fifty microliter of each supernatant were added to two adjacent wells of the ELISA plate, one containing 50 µL of PBS (blank) and the other containing 50 µL of 200 nM OTA in PBS. The ratio between the signals of both wells was used as the criterion for selecting the antibodies with the highest affinity. HT-HFCS culture medium was added to the selected wells. Next day, they were reevaluated by checkerboard competitive ELISA. This second screening assay was carried out with two coating concentrations of the homologous OVA–haptan conjugate (0.01 and

0.1 µg/mL), four supernatant dilutions (1/10, 1/50, 1/250, and 1/1250) and three OTA concentrations (0, 10, and 100 nM).

Cloning and hybridoma isolation. The content of the selected wells was diluted in HT-HFCS medium and then cultured in one 96-well plate (100 µL per well, 2 cells per well). After 7-10 days of incubation, wells were analysed under the microscope to identify single clones, 100 µL of complete medium were added and supernatants were again analysed by differential competitive ELISA. Positive ELISA wells presenting one clone were selected and cloned again as described before. This procedure was applied at least twice to assure the isolation of the cell line. After culturing the selected hybridomas at large-scale, part of the cells were collected by centrifugation, suspended in conservation medium and cryopreserved in liquid nitrogen in sterile 1-mL microtubes, while the rest of them were used for antibody production.

5.5.3 Monoclonal antibody production

Hybridoma culture and monoclonal antibody purification. The selected hybridomas were expanded in Petri dishes and cultured for 7-10 days in HT-HFCS medium. After removing cells by centrifugation, the supernatants were precipitated with one volume of SAS and were stored at 4 °C until purification.

Monoclonal antibody purification. After centrifugation (3800xg, 20 min), precipitates were dissolved in 8-10 mL of 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, and then filtered through a nitrocellulose membrane (0.45 µm pore diameter). The filtrate was purified by affinity chromatography using a 5-mL HiTrap Protein G HP column and a 5-mL Sephadex G 25 HiTrap Desalting with 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, as loading buffer (3 mL/min) and 100 mM citric acid buffer, pH 2.5, as elution buffer (3 mL/min). Fractions of 850 µL were collected and neutralised with 150 µL of 1 M Tris-HCl buffer, pH 9.5. After gathering the fractions containing antibody, the final solution was concentrated and the buffer was exchanged to 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, by centrifugation using Amicon® Ultra 4 10K centrifugal filters. Final antibody concentration was calculated using the absorption at 280 nm and a molar extinction coefficient of 1.4 L g⁻¹ cm⁻¹.

Monoclonal antibody storage. The purified monoclonal antibodies were diluted with 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, to a final concentration of 2 mg/mL and precipitated with one volume of SAS. A working aliquot was prepared by diluting the precipitate with PBS-BSA-thimerosal. All solutions were stored at 4 °C.

5.6 Preparation of LFIA components

5.6.1 Preparation of gold nanoparticles conjugates

NP@mAb. Commercial 40-nm GAM-modified gold nanoparticles (OD = 10) were diluted in Tris10 buffer (1/10). Monoclonal antibody was added from a stock solution in the same buffer, and the mixture was incubated for 1 h at rt. After addition of Tween-20 to a final concentration of 0.5% (v/v), conjugates were stored at 4 °C.

5.6.2 Preparation of immunostrips

Solutions of GAM or BSA–hapten (1 mg/mL) in PB with 150 mM of NaCl were dispensed on a nitrocellulose membrane (300x25 mm) at a flow rate of 0.5 µL/cm using a BioDot system. BSA–hapten test line and GAM control line were dispensed 10 mm and 15 mm from the base of the membrane, respectively. Membranes were dried at rt for 1 h and were stick at 14 mm from the base of the backing card (300x78 mm). Nitrocellulose sample pad (300x17 mm) and absorbent pad (300x43 mm) were assembled overlapping 3 mm and 4 mm, respectively, with the membrane. The assembled components were cut using a Biodot guillotine to provide 4x78 mm immunostrips, as shown in annex D.

5.7 Competitive immunoassays

5.7.1 Competitive ELISA

Antibody-coated direct competitive ELISA. Microplates were coated by overnight incubation with 100 µL per well of antibody solution in coating buffer at 4 °C. After washing the plates four times with washing solution, the competitive reaction was carried out with 50 µL of OTA solution in PBS and 50 µL of HRP tracer solution in PBS-T at rt for 1 h. After washing, the signal was generated by adding 100 µL per well of substrate solution, and the enzymatic reaction was stopped after a 10 min incubation at rt with 100 µL per well of 1 M H₂SO₄. The absorbance was read at 492 nm, using 650 nm as reference wavelength. When capture antibody was employed (GAM for mAbs or GAR for pAbs), a coating concentration of 2.2 µg/mL was used. The plates were incubated overnight at 4 °C, washed as described before and then 100 µL of a solution of the anti-OTA antibody in PBS-T were added. After incubating for 1 h at rt, the plates were washed again and the immunochemical competitive reaction was carried out as previously described. During the checkerboard titration antibodies were assayed in combination with homologous and heterologous enzymatic tracers. Microplates were coated with 1/4·10³, 1/12·10³, 1/36·10³ and

1/108·10³ dilutions of polyclonal antibodies or 30, 100, 300 and 1000 ng/mL solutions of monoclonal antibody. The enzymatic tracer concentrations assayed during the competition step were 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 ng/mL.

Conjugate-coated indirect competitive ELISA. Microplates were coated by overnight incubation at rt with 100 µL per well of OVA conjugate solution in coating buffer. Microwells were washed four times after each incubation step. The competitive immunochemical reaction was performed by mixing 50 µL per well of OTA solution in PBS and 50 µL per well of antibody solution in PBS-T, microplates were incubated for 1 h at rt. The retained mAb was indirectly detected with 100 µL per well of a HRP-labelled secondary antibody dilution (1/2000 dilution of RAM-HRP in PBS-T for mAbs and 1/10000 dilution of GAR-HRP in PBS-T with 10% (v/v) of FBS for pAbs). After 1 h incubation and washing, signal was generated and read as described before. During the checkerboard titration antibodies were assayed in combination with homologous and heterologous OVA-hapten conjugates. The coating concentrations of OVA-hapten were 10, 100 and 1000 ng/mL. Polyclonal antibody dilutions were 1/3·10³, 1/10·10³, 1/36·10³ and 1/100·10³ and monoclonal antibody concentrations were 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 ng/mL.

5.7.2 Competitive immunostrip

Dipstick immunostrip assays were carried out in 300-µL wells by mixing 10-25 of the colloidal gold conjugate in Tris10 buffer with 0.5% (v/v) of Tween-20 and the corresponding volume of an OTA solution in Tris100 buffer to reach 100 µL. The mixtures were incubated for 5 min at rt before the immunostrips were vertically dipped into the well for 10 min. Thereafter, sample pads were removed, membranes were dried for 3 min under a cold airflow and scanned for further signal processing.

5.7.3 Signal processing

ELISA. Absorbance at 492 nm (OPD) or 450 nm (TMB) was immediately read after assay finalisation using 650 nm as reference wavelength. Experimental values were fitted to a sigmoidal four-parameter logistic equation 5.2 and represented in semi-logarithmic scale with SigmaPlot software.²⁵²

$$y = \frac{A-D}{1+\left(\frac{x}{C}\right)^B} + D \quad \text{Equation 5.2}$$

In this equation, x and y represent the analyte concentration and the assay signal, respectively. Parameter A is the maximum asymptote (A_{\max}); parameter B represents the slope of the inhibition curve at the inflexion point; parameter C is the analyte concentration at the inflexion

point of the curve; and parameter D represents the minimum asymptote (A_{\min}). Parameter C is commonly called IC_{50} , and it was used as an estimation of the sensibility of the assay.

The theoretical limit of detection (LOD) was defined as the concentration capable of producing a 10% loss of the maximal signal (IC_{90}). The working range was established employing IC_{20} and IC_{80} concentration (concentrations capable of reducing the maximal signal by 80% and 20%, respectively). Finally, when necessary, absorbance values (A_i) were normalised using the absorbance obtained in the absence of analyte (A_0) by equation 5.3.

$$A_{\text{norm.i}} = \frac{A_i}{A_0} \quad \text{Equation 5.3}$$

Immunostrip. RGB signals of CL and TL were acquired using ImageJ free software and TL/CL ratios were calculated for all immunostrips. TL signals and TL/CL relations were normalised using the TL signal and TL/CL relation, respectively, of the immunostrips in absence of OTA. Data was fitted with SigmaPlot software to the sigmoidal four-parameter logistic curve shown in equation 5.2. LOD and working range were established for each inhibition curve as described for ELISA assays.

5.8 Optimization of immunoassays

5.8.1 pH and ionic strength optimization

ELISA. Immunoassays were carried out mixing 50 μL of the OTA standard curve prepared in MilliQ H_2O with 50 μL of immunoreagent prepared in 20 mM phosphate buffers with different pH and ionic strength conditions (6.0 - 8.5 and 50 - 275 mM, respectively). Buffers were prepared mixing 40 mM solutions of Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 , the ionic strength was adjusted by addition of NaCl. After adjusting the final buffer concentration to 20 mM with MilliQ H_2O , Tween-20 was added at 0.05% (v/v). PBS/PBS-T conditions were used as reference (pH 7.4 and $I = 166$ mM).

LFIA. Immunoassays were carried out mixing 80 μL of the OTA standard solution prepared in 100 mM Tris-HCl buffer with different pH and ionic strength conditions with 20 μL of NP@b310b (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, with 0.5% (v/v) Tween-20. Buffers were prepared by adjusting the pH of a 100 mM Tris-HCl solution with 10 M HCl, then ionic strength was calculated and adjusted with solid NaCl. 100mM Tris-HCl with 30 mM NaCl were used as reference (pH 8.0 and $I = 86$ mM).

In all cases, ionic strength was calculated assuming ideal solutions and using equation 5.4, where c_i is molar concentration of the ion in solution and z_i represents its formal charge.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad \text{Equation 5.4}$$

5.8.2 Evaluation of matrix effects

ELISA. 50 μL of standard OTA curves prepared in MilliQ H_2O with different matrix proportion were mixed with 50 μL the corresponding immunoreagents in 150 mM phosphate buffer, pH 7.4, with 0.05% (v/v) of Tween-20. The assayed matrix dilution were 1/10, 1/30, 1/1 \cdot 10², 1/3 \cdot 10² and 1/1 \cdot 10³. When the effect of PVPP was assessed, a 1/10 dilution of matrix in MilliQ H_2O was treated with 1, 2 or 4% (w/v) of PVPP by vigorously vortexing for 1 min. After centrifuging (4800xg, 10 min), the supernatant was used for the preparation of OTA standard curves. In all cases, results were fitted to a sigmoidal four-parameter logistic equation, the A_{max} and IC_{50} parameters were compared with the inhibition curve obtained without matrix (PB75/PB75-T).

5.8.3 Procedure of final developed assays

Competitive direct ELISA. Microplates were coated by overnight incubation at 4 $^{\circ}\text{C}$ with 100 μL per well with a 300 ng/mL solution of mAb f#223 in coating buffer. After washing the plates four times with washing solution, 50 μL of OTA solution (standard curve or treated samples) in PB75 were added to each well and were incubated for 30 min at rt. Afterwards, 50 μL per well of HRP–b tracer (60 ng/mL) were added and the mixtures were incubated for 30 min. After washing the plates, the coloured signal was obtained using 100 μL TMB as substrate. The signal was developed for 15 min at rt and the reaction was stopped using 100 μL of stop solution. Absorbance was read at 450 nm using 650 nm as reference wavelength.

Competitive immunostrip. Assays were carried out by incubating for 5 min at rt a mixture of 20 μL NP@b#310b (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, OD = 1) in Tris10 buffer and 80 μL of OTA solution (treated samples) in Tris100 buffer. Immunostrips prepared with BSA–e in the TL were vertically dipped into the wells for 10 min. After incubation, sample pads were removed and membranes were dried under a cold airflow for 3 min. Immunostrips were digitalised using an office scanner and RGB signals were acquired using ImageJ free software.

5.9 Recovery studies

Sample fortification. Grape wine and juice were fortified at 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 ng/mL for competitive ELISA and at 0.2, 0.5, 1 and 2 ng/mL for competitive immunostrip. Samples without OTA were used as control in all matrices.

Fortified samples analysis by competitive direct ELISA. After a 1/10 dilution of the fortified samples in PB75 buffer, 1-mL aliquots were treated with 1% or 4% (w/v) of PVPP in 1.5-mL Eppendorf by vigorously vortexing for 1 min. Mixtures were centrifuged (4800xg, 5 min) and supernatants were used as samples in the assay. A second 1/10 dilution of the supernatants in PB75 was applied on samples with OTA concentrations above 2 ng/mL. An 8-point standard OTA curve was concurrently run with the samples. OTA standard curve and samples were run as triplicates.

Fortified samples analysis by competitive immunostrip. A mixture containing 900 μL of OTA-spiked wine or grape juice sample, 900 μL of CH_2Cl_2 and 90 μL of 6 M H_3PO_4 was vigorously shaken in an overhead rotator for 15 min in a 2-mL Eppendorf. After centrifugation (4800xg, 3 min), 600 μL of the organic phase were extracted with 300 μL of Tris100 buffer in a 1.5-mL Eppendorf. 80 μL of the buffer extract were directly used for the assay.

Results treatment. ELISA average signals were interpolated in the standard OTA curve and the results were multiplied by the dilution factor to obtain the experimental OTA concentration (C_E) in the fortified sample. Recoveries (R) were calculated using the concentration of fortification (C_F) and equation 5.5.

$$R = \frac{C_E}{C_F} \times 100 \quad \text{Equation 5.5}$$

5.10 Validation of assays

Validation was carried out according to the protocol described in the Commission Regulation (EU) No 519/2014. STC was established at 2 ng/mL for all matrices. Four blank and four fortified samples with OTA at 0.5 and 2 ng/mL were analysed for five consecutive days using the developed assays ($n = 20$). *Cut-off* values and t values were calculated as described in section 3.6.3. False-suspect rates were calculated using the t values and the spreadsheet function DISTR.T.

5.11 Evaluation of commercial OTA kits

Commercial ELISA and LFIA kits for OTA detection were evaluated by analysing wine samples fortified with OTA at different concentrations. Samples were treated according to the instructions on the manual of each kit and recoveries were calculated for accuracy assessment. Analytical characteristic of the kits are included in annex E.

5.11.1 Evaluation of ELISA kits

ABRAXIS (53020BA).

Wine sample treatment. 1 mL of wine was diluted with 9 mL of 80% methanol-20% water-0.1% sodium bicarbonate in a 15 mL centrifuge tube. After mixing for 10 min in an overhead rotator, the mixture was centrifuged (3000xg, 5 min) and the supernatant was 1/7 diluted with a mixture of deionised H₂O and Dilution Buffer I (88:12).

Assay procedure. 100 µL of the standard or sample extract were added to the microwells and incubated for 30 min. Wells were washed and 100 µL of HRP conjugate were added to each well. After a 30 min incubation, wells were washed again and 150 µL per well of substrate solution were added and incubated for 20 min. Finally, 100 µL per well of stop solution were added and absorbance was read at 450 nm. All incubations were performed at rt.

BIOOSCIENTIFIC. (1036-02).

Wine sample treatment. The pH of a 1-mL aliquot of wine was adjusted by adding 100 µL of a 1 M solution of NaHCO₃. After adding 50 µL of Clean Up Buffer I and 50 µL of Clean Up Buffer II, the sample was vortexed for 1 min and centrifuged (4800xg, 5 min). The supernatant was diluted 120/1000 with a mixture 60:40 of PBS:methanol. 50 µL of this mixture were directly used during the assay.

Assay procedure. A mixture of 50 µL of standard or sample extract and 100 µL of Antibody#1 was incubated for 30 min in the microwells. After a washing step, 100 µL of Antibody#2 were added and, after 30 min incubation step, wells were washed again. Signal was generated with 100 µL of TMB for 15 min. After adding 100 µL of stop solution, absorbance was read at 450 nm. All incubations were performed at rt.

EuroProxima (5121OTA[2]07.19).

Wine sample treatment. A mixture of 1 mL of wine, 2 mL of CH₂Cl₂ and 20 µL of 6 M H₃PO₄ was mixed in an overhead rotator for 15 min at rt. After removing the aqueous phase, 1 mL of the organic phase was extracted with 0.5 mL of 50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer (pH 9.8) in an overhead rotator for 5 min. After centrifugation (4800xg, 5 min), 100 µL of the aqueous phase were diluted with 300 µL of dilution buffer.

Assay procedure. A mixture containing 50 µL of OTA standard or sample extract, 25 µL of HRP conjugate and 25 µL of antibody was incubated for 60 min at rt. After a washing step, 100 µL per well of substrate solution were added and incubated for 30 min at rt. Enzymatic reaction was stopped with 100 µL of stop solution and absorbance was read at 450 nm.

5.11.2 Evaluation of the LFIA kit

CHARM SCIENCE INC (LF-OCHRAQ-W-20K)

Wine sample treatment. A 1/10 dilution of the sample in Dilution buffer was directly used in the assay.

Assay procedure. Lateral flow immunoassays were run for 10 min in a Charm EZ-M incubator at 45 °C using 100 µL of the diluted sample.

6. REFERENCES

1. Eurobarómetro. Percepción de los riesgos relacionados con los alimentos. *Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición*. Available at: http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/noticias_efs/2010/percepcion_riesgos_alimentos.htm.
2. Patriarca, A. & Fernández Pinto, V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Curr. Opin. Food Sci.* **14**, 50–60 (2017).
3. Charmley, L. L., Trenholm, H. L., Prelusky, D. B. & Rosenberg, A. Economic losses and decontamination. *Nat. Toxins.* **3**, 199–203 (1995).
4. Hussein, H. S. & Brasel, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology.* **167**, 101–134 (2001).
5. Webster, J. & Weber, R. W. S. *Introduction to Fungi*. (Cambridge University Press, 2007).
6. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
7. Reddy, K. R. N. *et al.* An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev.* **29**, 3–26 (2010).
8. Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, B. & Theron, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature.* **205**, 1112–1113 (1965).
9. Merwe, K. J., Steyn, P. S. & Fourie, L. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.* 7083–7088 (1965).
10. Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W. & Goulden, M. L. Ochratoxin A : Occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Appl. Microbiol.* **17**, 765–766 (1969).
11. Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortes, L., Gonzalez-Jaen, M. T. & Vazquez, C. *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food Microbiol.* **46**, 168–175 (2015).
12. Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., Accensi, F. & Cabañes, F. J. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *J. Food Prot.* **60**, 1580–1582 (1997).
13. Samson, R. A., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M. & Jens, C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud. Mycol.* **50**, 45–61 (2004).

14. Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A. & Samson, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* **50**, 23–43 (2004).
15. Ostefeld Larsen, T., Svendsen, A. & Smedsgaard, J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3630–3635 (2001).
16. Nguyen, H. D. T. *et al.* Ochratoxin A production by *Penicillium thymicola*. *Fungal Biol.* **120**, 1041–1049 (2016).
17. Huff, W. E. & Hamilton, P. B. Mycotoxins – Their biosynthesis in Fungi: ochratoxins – Metabolites of combined pathways. *J. Food Prot.* **42**, 815–820 (1979).
18. Harris, J. P. & Mantle, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry.* **58**, 709–716 (2001).
19. Gallo, A. *et al.* New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 8208–8218 (2012).
20. Wang, Y. *et al.* A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway: insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, 1–15 (2018).
21. Davis, N. D., Searcy, J. W. & Diener, U. L. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.* **17**, 742–744 (1969).
22. Abbas, A., Valez, H. & Dobson, A. D. W. Analysis of the effect of nutritional factors on OTA and OTB biosynthesis and polyketide synthase gene expression in *Aspergillus ochraceus*. *Int. J. Food Microbiol.* **135**, 22–27 (2009).
23. Kapetanakou, A. E., Panagou, E. Z., Gialitaki, M., Drosinos, E. H. & Skandamis, P. N. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Control.* **20**, 725–732 (2009).
24. Steyn, P. S. & Holzapfel, C. W. The synthesis of ochratoxins A and B. Metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Tetrahedron.* **23**, 4449–4461 (1967).
25. Roberts, J. C. & Woollven, P. Synthesis of ochratoxin A, a metabolite of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **2**, 278–281 (1970).
26. Kraus, G. A. A facile synthesis of ochratoxin A. *J. Org. Chem.* **46**, 201–202 (1981).
27. Gabriele, B. *et al.* A new and expedient total synthesis of ochratoxin A and d5-ochratoxin A. *Synthesis.* 1815–1820 (2009).
28. Bouisseau, A., Roland, A., Reillon, F., Schneider, R. & Cavelier, F. First synthesis of a stable isotope of ochratoxin A metabolite for a reliable detoxification monitoring. *Organic Lett.* **15**, 3888–3890 (2013).
29. Cramer, B., Harrer, H., Nakamura, K., Uemura, D. & Humpf, H. U. Total synthesis and cytotoxicity evaluation of all ochratoxin A stereoisomers. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 343–347 (2010).
30. Sibi, M. P., Chattopadhyay, S., Dankwardt, J. W. & Snieckus, V. Combinational O-aryl carbamate and benzamide directed ortho metalation reactions. Synthesis of ochratoxin A and ochratoxin B. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6312–6315 (1985).
31. Donner, C. D. & Gill, M. Total synthesis of (R)-ochratoxin α and the formal total synthesis of ochratoxin A. *Aust. J. Chem.* **55**, 213–217 (2002).
32. Lenz, C. A. & Rychlik, M. Efficient synthesis of (R)-ochratoxin alpha, the key precursor to the mycotoxin ochratoxin A. *Tetrahedron Lett.* **54**, 883–886 (2013).
33. Li, W., Wiesenfeldt, M. P. & Glorius, F. Ruthenium-NHC-diamine catalyzed enantioselective hydrogenation of isocoumarins. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 2585–2588 (2017).
34. O'Brien, E. & Dietrich, D. R. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 33–60 (2005).
35. Pfohl-Leszkowicz, A. & Manderville, R. A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity

- in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 61–99 (2007).
36. Creppy, E. E. *et al.* Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicol. Lett.* **19**, 217–224 (1983).
 37. Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerger, S., Silbernagl, S. & Gekle, M. The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol. Toxicol.* **15**, 405–415 (1999).
 38. Atroshi, F. *et al.* Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, 281–291 (2000).
 39. Haubeck, H. D., Lorkowski, G., Koelsch, E. & Roeschenthaler, R. Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1040–1042 (1981).
 40. Boorman, G. A. *et al.* Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72**, 304–312 (1984).
 41. Rottkord, U. *et al.* Structure–activity relationship of ochratoxin A and synthesized derivatives: importance of amino acid and halogen moiety for cytotoxicity. *Arch. Toxicol.* **91**, 1461–1471 (2017).
 42. Xiao, H. *et al.* Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: Structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **137**, 182–192 (1996).
 43. Peckham, J. C., Doupnik, B. & Jones, O. H. Acute toxicity of ochratoxins A and B in chicks. *Appl. Microbiol.* **21**, 492–494 (1971).
 44. Mally, A. *et al.* Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **206**, 43–53 (2005).
 45. Knasmüller, S. *et al.* Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: Implications for risk assessment. *Nutr. Cancer.* **50**, 190–197 (2004).
 46. Heussner, A. H. & Bingle, L. E. H. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins.* **7**, 4253–4282 (2015).
 47. Szczech, G. M., Carlton, W. W. & Hinsman, E. J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. *Vet. Path.* **10**, 135–154 (1973).
 48. Fuchs, R. & Peraica, M. Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Addit. Contam.* **22**, 53–57 (2005).
 49. Stander, M. A., Steyn, P. S., Van der Westhuizen, F. H. & Payne, B. E. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 302–304 (2001).
 50. Kumagai, S. Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chem. Toxicol.* **23**, 941–943 (1985).
 51. Mobashar, M., Hummel, J., Blank, R. & Südekum, K. H. Ochratoxin A in ruminants - a review on its degradation by gut microbes and effects on animals. *Toxins.* **2**, 809–839 (2010).
 52. Elling, F. Ochratoxin A - Induced mycotoxic porcine nephropathy: Alterations in enzyme activity in tubular cells. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.* **87**, 237–243 (1979).
 53. COMMISSION REGULATION (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
 54. COMMISSION REGULATION (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
 55. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs.
 56. FAO & WHO. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (193-1995). *CODEX ALIMENTARIUS*.
 57. FAO & WHO. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A contamination in

- Cocoa (72-2013). *CODEX ALLIMENTARIUS*.
58. FAO & WHO. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Ochratoxin A contamination in Wine (63-2007). *CODEX ALLIMENTARIUS*.
59. FAO & WHO. Code of Practice for prevention and reduction of ochratoxin A contamination in Coffee (69-2009). *CODEX ALLIMENTARIUS*.
60. FAO & WHO. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Mycotoxin contamination in Cereals (51-2003). *CODEX ALLIMENTARIUS*.
61. Mitchell, N. J. *et al.* A risk assessment of dietary Ochratoxin a in the United States. *Food Chem. Toxicol.* **100**, 265–273 (2017).
62. EFSA. Scientific opinion. Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA J.* **18**, (2020).
63. Araguás, C., González-Peñas, E. & López De Cerain, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chem.* **92**, 459–464 (2005).
64. Sarigiannis, Y., Kapolos, J., Koliadima, A., Tsegenidis, T. & Karaiskakis, G. Ochratoxin A levels in Greek retail wines. *Food Control.* **42**, 139–143 (2014).
65. Benites, A. J. *et al.* Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control.* **73**, 1223–1228 (2017).
66. Remiro, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E. & López de Cerain, A. Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines. *Food Control.* **27**, 139–145 (2012).
67. Remiro, R., Irigoyen, A., González-Peñas, E., Lizarraga, E. & López de Cerain, A. Levels of ochratoxins in Mediterranean red wines. *Food Control.* **32**, 63–68 (2013).
68. Bellver Soto, J., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M. J. & Juan-García, A. Presence of ochratoxin a (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern european countries: Wine and beer. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 7643–7651 (2014).
69. Gentile, F. *et al.* Organic wine safety: UPLC-FLD determination of Ochratoxin A in Southern Italy wines from organic farming and winemaking. *Food Control.* **59**, 20–26 (2016).
70. Burdaspal, P. & Legarda, T. Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. *Food Addit. Contam.* **24**, 976–986 (2007).
71. Brera, C. *et al.* Ochratoxin A contamination in Italian wine samples and evaluation of the exposure in the Italian population. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10611–10618 (2008).
72. Jodlbauer, J., Maier, N. M. & Lindner, W. Towards ochratoxin A selective molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.* **945**, 45–63 (2002).
73. Baggiani, C. *et al.* Effect of the mimic structure on the molecular recognition properties of molecularly imprinted polymers for ochratoxin A prepared by a fragmental approach. *React. Funct. Polym.* **73**, 833–837 (2013).
74. Pacheco, J. G. *et al.* Molecularly imprinted electrochemical sensor for ochratoxin A detection in food samples. *Sens. Actuators B Chem.* **215**, 107–112 (2015).
75. Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simon, B. & Marty, J. L. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control.* **22**, 737–743 (2011).
76. Rivas, L. *et al.* Label-free impedimetric aptasensor for ochratoxin-A detection using iridium oxide nanoparticles. *Anal. Chem.* **87**, 5167–5172 (2015).
77. Mishra, R. K., Hayat, A., Catanante, G., Istamboulie, G. & Marty, J. L. Sensitive quantitation of ochratoxin A in cocoa beans using differential pulse voltammetry based aptasensor. *Food Chem.* **192**, 799–804 (2016).
78. Visconti, A., Pascale, M. & Centonze, G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **84**, 1818–1827 (2001).

REFERENCES

79. Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A., Donadini, G. & Pietri, A. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control*. **22**, 2059–2064 (2011).
80. Quintela, S., Villarán, M. C., López de Armentia, I. & Elejalde, E. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. *Food Control*. **25**, 501–504 (2012).
81. Cao, J. *et al.* Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in beer, red wine, and grape juice. *J. Sep. Sci.* **36**, 1291–1297 (2013).
82. Giovannoli, C., Passini, C., Di Nardo, F., Anfossi, L. & Baggiani, C. Determination of ochratoxin A in Italian red wines by molecularly imprinted solid phase extraction and HPLC analysis. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 5220–5225 (2014).
83. Wang, M. *et al.* A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **1429**, 22–29 (2016).
84. Lhotská, I., Šatínský, D., Havlíková, L. & Solich, P. A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 3319–3329 (2016).
85. Leal, T., Abrunhosa, L., Domingues, L., Venâncio, A. & Oliveira, C. BSA-based sample clean-up columns for ochratoxin A determination in wine: Method development and validation. *Food Chem.* **300**, 125204 (2019).
86. Vaclavik, L., Vaclavikova, M., Begley, T. H., Krynetsky, A. J. & Rader, J. I. Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* **61**, 4822–4830 (2013).
87. Mariño-Repizo, L., Gargantini, R., Manzano, H., Raba, J. & Cerutti, S. Assessment of ochratoxin A occurrence in Argentine red wines using a novel sensitive quechers-solid phase extraction approach prior to ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology. *J. Agric. Food Chem.* **97**, 2487–2497 (2017).
88. Wei, D. *et al.* Determination of ochratoxin A contamination in grapes, processed grape products and animal-derived products using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy system. *Sci. Rep.* **8**, 1–8 (2018).
89. Li, Y., Zhang, N., Wang, H. & Zhao, Q. An immunoassay for ochratoxin A using tetramethylrhodamine-labeled ochratoxin A as a probe based on a binding-induced change in fluorescence intensity. *Analyst*. **145**, 651–655 (2020).
90. Yu, F. Y., Vdovenko, M. M., Wang, J. J. & Sakharov, I. Y. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays with chemiluminescent and colorimetric detection for the determination of ochratoxin A in food. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 809–813 (2011).
91. Aulund, O., Brunfeldts, K., Huld, B., Krogh, P. & Poulsen, K. A radioimmunoassay for ochratoxin A: a preliminary investigation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. C*. **83**, 390–392 (1975).
92. Pavón, M. A., González, I., Martín, R. & García, T. Competitive direct ELISA based on a monoclonal antibody for detection of Ochratoxin A in dried fig samples. *Food Agric. Immunol.* **23**, 83–91 (2012).
93. Anfossi, L., D'Arco, G., Baggiani, C., Giovannoli, C. & Giraudi, G. A lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A: Development of a single system for maize, wheat and durum wheat. *Food Control*. **22**, 1965–1970 (2011).
94. Burmistrova, N. A., Rusanova, T. Y., Yurasov, N. A., Goryacheva, I. Y. & De Saeger, S. Multi-detection of mycotoxins by membrane based flow-through immunoassay. *Food Control*. **46**, 462–469 (2014).
95. Uchigashima, M., Yamaguchi, Y., Narita, H., Nakajima, M. & Miyake, S. Development of an immuno-affinity column for ochratoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody. *Methods*. **56**, 180–185 (2012).
96. Rehmat, Z., Mohammed, W. S., Sadiq, M. B., Somarapalli, M. & Kumar Anal, A. Ochratoxin A detection

- in coffee by competitive inhibition assay using chitosan-based surface plasmon resonance compact system. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **174**, 569–574 (2019).
97. Landsteiner, K. *The Specificity of Serological Reactions*. (Dover Publications, 1962).
98. 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.* **30**, 572–580 (1982).
99. López-Moreno, R., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Immunoassays for trifloxystrobin analysis. Part I. Rational design of regioisomeric haptens and production of monoclonal antibodies. *Food Chem.* **152**, 230–236 (2014).
100. Huisman, H., Wynveen, P. & Setter, P. W. Studies on the immune response and preparation of antibodies against a large panel of conjugated neurotransmitters and biogenic amines: Specific polyclonal antibody response and tolerance. *J. Neurochem.* **112**, 829–841 (2010).
101. Parra, J., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Fuentes, A. & Abad-Somovilla, A. Concise and modular synthesis of regioisomeric haptens for the production of high-affinity and stereoselective antibodies to the strobilurin azoxystrobin. *Tetrahedron*. **67**, 624–635 (2011).
102. Mercader, J. V. & Montoya, A. Development of monoclonal ELISAs for azinphos-methyl. 1. Hapten synthesis and antibody production. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1276–1284 (1999).
103. Khreich, N. *et al.* A highly sensitive competitive enzyme immunoassay of broad specificity quantifying microcystins and nodularins in water samples. *Toxicol.* **53**, 551–559 (2009).
104. Xu, Z. L. *et al.* Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: A review. *Anal. Chim. Acta.* **647**, 125–136 (2009).
105. Wang, Z. *et al.* Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Anal. Chem.* **79**, 4471–4483 (2007).
106. Bredenkamp, M. W., Dillen, J. L. M., van Rooyen, P. H. & Steyn, P. S. Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: probing the chemical structure causing toxicity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*. **1**, 1835 (1989).
107. Dais, P., Stefanaki, I., Fragaki, G. & Mikros, E. Conformational analysis of ochratoxin a by NMR spectroscopy and computational molecular modeling. *J. Phys. Chem. B. Chem B* **109**, 16926–16936 (2005).
108. Hermanson, G. *Vaccines and Immunogen Conjugates in Bioconjugate Techniques*. 839-865. Academic Press: San Diego. (2013).
109. Parra, J., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Generation of anti-azoxystrobin monoclonal antibodies from regioisomeric haptens functionalized at selected sites and development of indirect competitive immunoassays. *Anal. Chim. Acta.* **715**, 105–112 (2012).
110. Mercader, J. V., Esteve-Turrillas, F. A., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Antibody generation and immunoassay development in diverse formats for pyrimethanil specific and sensitive analysis. *Analyst.* **137**, 5672–5679 (2012).
111. Adamczyk, M. *et al.* Characterization of Protein—Hapten conjugates. 1. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of immuno BSA—Hapten conjugates and comparison with other characterization methods. *Bioconjug. Chem.* **5**, 631–635 (1994).
112. Ceballos-Alcantarilla, E. *et al.* Haptens, bioconjugates, and antibodies for penthiopyrad immunosensing. *Analyst.* **139**, 5358–5361 (2014).
113. Huisgen, R., Knorr, R., Möbius, L. & Szeimies, G. 1,3-Dipolar cycloadditions. XXI. Capture of the keto azene intermediates during the photolysis of acyl azides. *Chem. Ber.* **98**, 4014–4021 (1965).
114. Liang, L. & Astruc, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) ‘click’ reaction and its applications. An overview. *Coord. Chem. Rev.* **255**, 2933–2945 (2011).
115. Haldón, E., Nicasio, M. C. & Pérez, P. J. Copper-catalysed azide-alkyne cycloadditions (CuAAC): An update. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9528–9550 (2015).

REFERENCES

116. Presolski, S. I., Hong, V., Cho, S.-H. & Finn, M. G. Tailored ligand acceleration of the Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction: Practical and mechanistic implications. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 14570–14576 (2010).
117. Siren, E. M. J., Singh, S. & Kluger, R. Bioorthogonal phase-directed copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (PDCuAAC) coupling of selectively cross-linked superoxide dismutase dimers produces a fully active bis-dimer. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 10244–10249 (2015).
118. Paper, J. M., Mukherjee, T. & Schrick, K. Bioorthogonal click chemistry for fluorescence imaging of choline phospholipids in plants. *Plant Methods.* **14**, 1–14 (2018).
119. Pawlak, M., Mistlberger, G. & Bakker, E. In situ surface functionalization of plasticized poly(vinyl chloride) membranes by ‘click chemistry’. *J. Mater. Chem.* **22**, 12796–12801 (2012).
120. Sánchez-Tirado, E., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J. M. Carbon nanotubes functionalized by click chemistry as scaffolds for the preparation of electrochemical immunosensors. Application to the determination of TGF-beta 1 cytokine. *Analyst.* **141**, 5730–5737 (2016).
121. Almenar, E., Gaviña, P., Costero, A. M., Gil, S. & Parra, M. Towards the fluorogenic detection of peroxide explosives through host – guest chemistry. *R. Soc. Open Sci.* **5**, 1–5 (2018).
122. Sanders, M. *et al.* An immunogen synthesis strategy for the development of specific anti-deoxyvalenol monoclonal antibodies. *Food Addit. Contam. Part A.* **31**, 1751–1759 (2014).
123. Vasylieva, N. *et al.* Sensitive immunoassay for detection and quantification of the neurotoxin, tetramethylenedisulfotetramine. *Anal. Chem.* **89**, 5612–5619 (2017).
124. Kaltgrad, E. *et al.* Anti-carbohydrate antibodies elicited by polyvalent display on a viral scaffold. *ChemBioChem.* **8**, 1455–1462 (2007).
125. Chodon, T., Koya, R. C. & Odunsi, K. Active immunotherapy of cancer. *Immunol. Invest.* **44**, 817–836 (2015).
126. Stills, H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund’s complete and other adjuvants. *ILAR J.* **46**, 280–93 (2005).
127. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Inmunobiología de Janeway. McGraw-Hill Interamericana: México.* (2008).
128. Freund, J., Casals, J. & Hosmer, E. P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **37**, 509–513 (1937).
129. Kindt, T. J., Goldsby, R. A. & Osborne, B. A. *Inmunología de Kuby. McGraw-Hill.* (McGraw-Hill, 2007).
130. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* **256**, 495–497 (1975).
131. Altshuler, E. P., Serebryanaya, D. V & Katrukha, A. G. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Biochem. (Mosc).* **75**, 1584–1605 (2010).
132. Abad, A. & Montoya, A. Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1818–1823 (1994).
133. Mercader, J. V., Suárez-Pantaleón, 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.* **56**, 7682–7690 (2008).
134. Parra, J., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Synthesis of azoxystrobin transformation products and selection of monoclonal antibodies for immunoassay development. *Toxicol. Lett.* **210**, 240–247 (2012).
135. Wright, R. M. *et al.* A high-capacity alkaline phosphatase reporter system for the rapid analysis of specificity and relative affinity of peptides from phage-display libraries. *J. Immunol. Methods.* **253**, 223–232 (2001).
136. Girotti, S. *et al.* Development of a chemiluminescent ELISA and a colloidal gold-based LFIA for TNT detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 687–695 (2010).

137. Abad, A., Primo, J. & Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to carbaryl. 1. Antibody production from several haptens and characterization in different immunoassay formats. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1486–1494 (1997).
138. 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.* **56**, 1545–1552 (2008).
139. Mercader, J. V., Suárez-Pantaleón, C., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Hapten synthesis and monoclonal antibody-based immunoassay development for detection of the fungicide trifloxystrobin. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2581–2588 (2008).
140. Li, X. *et al.* Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in agro-food. *Biosens. Bioelectron.* **49**, 426–432 (2013).
141. Di Nardo, F. *et al.* Validation of a qualitative immunochromatographic test for the noninvasive assessment of stress in dogs. *J. Chromatogr. B.* **1028**, 192–198 (2016).
142. Koczula, K. M. & Gallotta, A. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* **60**, 111–120 (2016).
143. Tripathi, P., Upadhyay, N. & Nara, S. Recent advancements in lateral flow immunoassays: A journey for toxin detection in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1715–1734 (2018).
144. Taranova, N. A., Berlina, A. N., Zherdev, A. V. & Dzantiev, B. B. ‘Traffic light’ immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk. *Biosens. Bioelectron.* **63**, 255–261 (2015).
145. Sun, Y. *et al.* Development of an immunochromatographic test strip for simultaneous qualitative and quantitative detection of ochratoxin A and zearalenone in cereal. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 3673–3678 (2016).
146. Xie, Z., Kong, D., Liu, L., Song, S. & Kuang, H. Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the simultaneous detection of avermectin and ivermectin. *Food Agric. Immunol.* **28**, 439–451 (2017).
147. Pilavaki, E. & Demosthenous, A. Optimized lateral flow immunoassay reader for the detection of infectious diseases in developing countries. *Sensors.* **17**, 1–11 (2017).
148. Majdinasab, M., Zareian, M., Zhang, Q. & Li, P. Development of a new format of competitive immunochromatographic assay using secondary antibody–europium nanoparticle conjugates for ultrasensitive and quantitative determination of ochratoxin A. *Food Chem.* **275**, 721–729 (2019).
149. Shelver, W. L. *et al.* Hapten syntheses and antibody generation for the development of a polybrominated flame retardant ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3840–3847 (2005).
150. Kim, K. O., Kim, Y. J., Lee, Y. T., Hammock, B. D. & Lee, H. S. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide bromophos-ethyl. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6675–6682 (2002).
151. Ahn, K. C., Watanabe, T., Gee, S. J. & Hammock, B. D. Hapten and antibody production for a sensitive immunoassay determining a human urinary metabolite of the pyrethroid insecticide permethrin. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4583–4594 (2004).
152. Candlish, A. A. G., Stimson, W. H. & Smith, J. E. A monoclonal antibody to ochratoxin A. *Lett. Appl. Microbiol.* **3**, 9–11 (1986).
153. Kawamura, O. *et al.* A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies. *Toxicon.* **27**, 887–897 (1989).
154. Clarke, J. R., Marouardt, R. R. & Frohlich, A. Comparative studies on the specificity and sensitivity of rabbit and laying-hen antisera to ochratoxin A. *Food Agric. Immunol.* **7**, 33–42 (1995).
155. Wang, X. H., Liu, T., Xu, N., Zhang, Y. & Wang, S. Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for ochratoxin A: Investigation of analytical conditions and sample matrix on assay performance. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 903–911 (2007).
156. Li, X. *et al.* A sensitive immunoaffinity column-linked indirect competitive ELISA for ochratoxin A in

- cereal and oil products based on a new monoclonal antibody. *Food Anal. Methods*. **6**, 1433–1440 (2013).
157. Oplatowska-Stachowiak, M. *et al.* T-2 toxin / HT-2 toxin and ochratoxin A ELISAs development and in-house validation in food in accordance with Commission Regulation (EU) No 519/2014. *Toxins*. **9**, 1–18 (2017).
158. Urusov, A. E., Kostenko, S. N., Sveshnikov, P. G., Zherdev, A. V. & Dzantiev, B. B. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A. *J. Analyt. Chem.* **66**, 770–776 (2011).
159. Chu, F. S., Chang, F. C. C. & Hinsdill, R. D. Production of antibody against ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 831–835 (1976).
160. Zhang, A. *et al.* Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*. **22**, 1723–1728 (2011).
161. Pestka, J. J., Steinert, B. W. & Chu, F. S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1472–1474 (1981).
162. He, Q. H. *et al.* Simultaneous multiresidue determination of mycotoxins in cereal samples by polyvinylidene fluoride membrane based dot immunoassay. *Food Chem.* **134**, 507–512 (2012).
163. Rousseau, D. M. *et al.* Detection of ochratoxin A in porcine kidneys by a monoclonal antibody-based radioimmunoassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 514–518 (1987).
164. Clarke, J. R. *et al.* Development of a quantitative and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A using antibodies from the yolk of the laying hen. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1784–1789 (1993).
165. Barna-Vetró, I. *et al.* Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 4071–4074 (1996).
166. Liu, X. *et al.* VHH phage-based competitive real-time immuno-polymerase chain reaction for ultrasensitive detection of ochratoxin A in cereal. *Anal. Chem.* **86**, 7471–7477 (2014).
167. Gyöngyösi-Horváth, Á., Barna-Vetró, I. & Solti, L. A new monoclonal antibody detecting ochratoxin A at the picogram level. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 103–105 (1996).
168. Majdinasab, M. *et al.* Ultrasensitive and quantitative gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection of ochratoxin A in agro-products. *J. Chromatogr. B.* **974**, 147–154 (2015).
169. Thirumala-Devi, K. *et al.* Production of polyclonal antibodies against Ochratoxin A and its detection in chilies by ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5079–5082 (2000).
170. Venkataramana, M. *et al.* Development of sandwich dot-ELISA for specific detection of ochratoxin A and its application on to contaminated cereal grains originating from India. *Front. Microbiol.* **6**, 1–11 (2015).
171. Shim, W. B. *et al.* Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A. *Int. J. Food. Sci. Technol.* **39**, 829–837 (2004).
172. Zhang, X. *et al.* Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon.* **106**, 89–96 (2015).
173. Cho, Y. J. *et al.* Production of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application to immunochromatographic assay. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8447–8451 (2005).
174. Chen, W., Jin, Y., Liu, A., Wang, X. & Chen, F. Rapid detection of ochratoxin A on membrane by dot immunogold filtration assay. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 610–614 (2016).
175. Yu, F., Chi, T., Liu, B. & Su, C. Development of a sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the determination of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6947–6953 (2005).
176. Alarcón, S. H. *et al.* Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat. *Talanta.* **69**, 1031–1037 (2006).

177. Zhang, Y. *et al.* Broad-specificity immunoassay for simultaneous detection of ochratoxins A, B, and C in millet and maize. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 4830–4838 (2017).
178. Saha, D., Acharya, D. & Dhar, T. K. Method for homogeneous spotting of antibodies on membranes: Application to the sensitive detection of ochratoxin A. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 847–854 (2006).
179. Huang, B., Tao, W., Shi, J., Tang, L. & Jin, J. Determination of ochratoxin A by polyclonal antibodies based sensitive time-resolved fluoroimmunoassay. *Arch. Toxicol.* **80**, 481–485 (2006).
180. Liu, L., Xu, L., Suryoprabowo, S., Song, S. & Kuang, H. Development of an immunochromatographic test strip for the detection of ochratoxin a in red wine. *Food Agric. Immunol.* **29**, 434–444 (2017).
181. Tullila, A. & Nevanen, T. K. Utilization of multi-immunization and multiple selection strategies for isolation of hapten-specific antibodies from recombinant antibody phage display libraries. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
182. van Houwelingen, A., De Saeger, S., Rusanova, T., Waalwijk, C. & Beekwilder, J. Generation of recombinant alpaca VHH antibody fragments for the detection of the mycotoxin ochratoxin A. *World Mycotoxin J.* **1**, 407–417 (2008).
183. Zhang, M. *et al.* Highly sensitive simultaneous detection of major ochratoxins by an immunochromatographic assay. *Food Control.* **84**, 215–220 (2018).
184. Liu, B. H., Tsao, Z. J., Wang, J. J. & Yu, F. Y. Development of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Anal. Chem.* **80**, 7029–7035 (2008).
185. Zhang, X. *et al.* Dual flow immunochromatographic assay for rapid and simultaneous quantitative detection of ochratoxin A and zearalenone in corn, wheat, and feed samples. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **19**, 871–883 (2018).
186. Shim, W. B., Dzantiev, B. B., Eremin, S. A. & Chung, D. H. One-step simultaneous immunochromatographic strip test for multianalysis of ochratoxin A and zearalenone. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 83–92 (2009).
187. Shao, Y. *et al.* Biotin-streptavidin system-mediated ratiometric multiplex immunochromatographic assay for simultaneous and accurate quantification of three mycotoxins. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 9022–9031 (2019).
188. Zezza, F., Longobardi, F., Pascale, M., Eremin, S. A. & Visconti, A. Fluorescence polarization immunoassay for rapid screening of ochratoxin A in red wine. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 1317–1323 (2009).
189. Liu, X. *et al.* Development of a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein and its application in a highly sensitive direct competitive fluorescence enzyme immunoassay for detection of ochratoxin a in cereal. *Anal. Chem.* **87**, 1387–1394 (2015).
190. Liang, Y., Huang, X., Yu, R., Zhou, Y. & Xiong, Y. Fluorescence ELISA for sensitive detection of ochratoxin A based on glucose oxidase-mediated fluorescence quenching of CdTe QDs. *Anal. Chim. Acta.* **936**, 195–201 (2016).
191. Mahdi, M., Mansour, B. & Afshin, M. Competitive immunoassay for ochratoxin a based on FRET from quantum dot-labeled antibody to rhodamine-coated magnetic silica nanoparticles. *Microchim. Acta.* **183**, 3093–3099 (2016).
192. Saucedo-Friebe, J. C. *et al.* Regenerable immuno-biochip for screening ochratoxin A in green coffee extract using an automated microarray chip reader with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* **689**, 234–242 (2011).
193. Kim, S. & Lim, H. B. Chemiluminescence immunoassay using magnetic nanoparticles with targeted inhibition for the determination of ochratoxin A. *Talanta.* **140**, 183–188 (2015).
194. Yang, J. *et al.* Label-free photoelectrochemical immunosensor for sensitive detection of Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* **64**, 13–18 (2015).
195. Karczmarczyk, A., Baeumner, A. J. & Feller, K. H. Rapid and sensitive inhibition-based assay for the

- electrochemical detection of ochratoxin A and aflatoxin M1 in red wine and milk. *Electrochim. Acta* **243**, 82–89 (2017).
196. Kunene, K. *et al.* Highly-efficient electrochemical label-free immunosensor for the detection of ochratoxin A in coffee samples. *Sens. Actuators B Chem.* **305**, (2020).
197. Vidal, J. C., Duato, P., Bonel, L. & Castillo, J. R. Use of polyclonal antibodies to ochratoxin A with a quartz-crystal microbalance for developing real-time mycotoxin piezoelectric immunosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 575–582 (2009).
198. Pirinçci, Ş. Ş. *et al.* Label-free QCM immunosensor for the detection of ochratoxin A. *Sensors.* **18**, (2018).
199. Karczmarczyk, A., Haupt, K. & Feller, K. H. Development of a QCM-D biosensor for ochratoxin A detection in red wine. *Talanta.* **166**, 193–197 (2017).
200. Ngundi, M. M. *et al.* Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages. *Anal. Chem.* **77**, 148–154 (2005).
201. Pagkali, V. *et al.* Detection of ochratoxin A in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor. *J. Hazard. Mater.* **323**, 75–83 (2017).
202. Viter, R. *et al.* Analytical, thermodynamical and kinetic characteristics of photoluminescence immunosensor for the determination of Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* **99**, 237–243 (2018).
203. Cruz-Aguado, J. A. & Penner, G. Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10456–10461 (2008).
204. McKeague, M. *et al.* Selection and characterization of a novel DNA aptamer for label-free fluorescence biosensing of ochratoxin A. *Toxins.* **6**, 2435–2452 (2014).
205. Shen, P. *et al.* A competitive aptamer chemiluminescence assay for ochratoxin A using a single silica photonic crystal microsphere. *Anal. Biochem.* **554**, 28–33 (2018).
206. Tian, J. *et al.* Fluorescence resonance energy transfer aptasensor between nanoceria and graphene quantum dots for the determination of ochratoxin A. *Anal. Chim. Acta.* **1000**, 265–272 (2018).
207. Cruz-Aguado, J. A. & Penner, G. Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers. *Anal. Chem.* **80**, 8853–8855 (2008).
208. Zhou, W. *et al.* An aptamer based lateral flow strip for on-site rapid detection of ochratoxin A in *Astragalus membranaceus*. *J. Chromatogr. B.* **1022**, 102–108 (2016).
209. Baggiani, C., Giraudi, G. & Vanni, A. A molecular imprinted polymer with recognition properties towards the carcinogenic mycotoxin ochratoxin A. *Bioseparation.* **10**, 389–394 (2002).
210. Turner, N. W. *et al.* Effect of the solvent on recognition properties of molecularly imprinted polymer specific for ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1060–1067 (2004).
211. Turan, E. & Şahin, F. Molecularly imprinted biocompatible magnetic nanoparticles for specific recognition of ochratoxin A. *Sens. Actuators B Chem.* **227**, 668–676 (2016).
212. Ali, W. H. *et al.* Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *J. Chromatogr. A.* **1217**, 6668–6673 (2010).
213. Lee, T. P., Saad, B., Khayoon, W. S. & Salleh, B. Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro-solid phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine. *Talanta.* **88**, 129–135 (2012).
214. Boyarskii, V. P. Catalytic systems for carbonylation of aryl halides. *Russ. J. Gen. Chem.* **78**, 1742–1753 (2008).
215. Cheng, K., Wang, X. & Yin, H. Small-molecule inhibitors of the TLR3/dsRNA complex. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3764–3767 (2011).
216. Anderson, E. M., Larsson, K. M. & Kirk, O. One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransformation* **16**, 181–204 (1998).
217. Albericio, F. *et al.* On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase

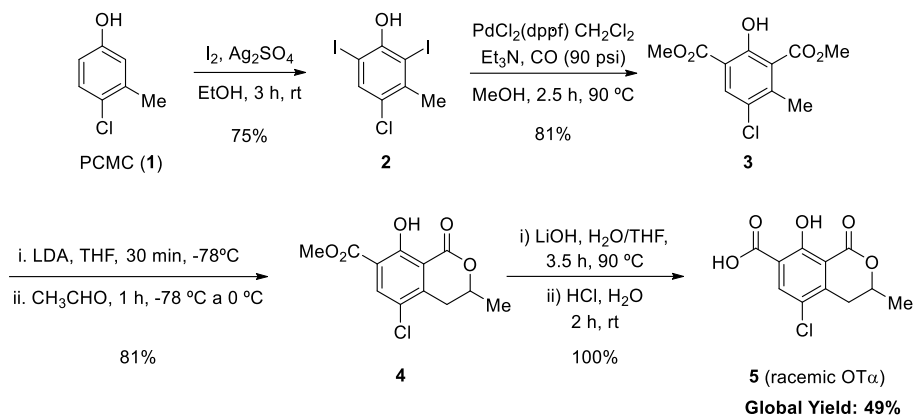
- peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **38**, 4853–4856 (1997).
218. Phillips, G. A., Wright, T. B., Stevens, A. C. & Pagenkopf, B. L. Synthesis of (+)-bovic acid. *Can. J. Chem.* **93**, 196–198 (2015).
219. Saito, Y. *et al.* C8-alkynyl- and alkylamino substituted 2'-deoxyguanosines: a universal linker for nucleic acids modification. *Tetrahedron.* **64**, 3578–3588 (2008).
220. Tsujimoto, T. & Ito, Y. Concise syntheses of immunostimulating glycolipids, α -galactosyl ceramides. *Tetrahedron Lett.* **48**, 5513–5516 (2007).
221. Koviach, J. L., Chappell, M. D. & Halcomb, R. L. Design and synthesis of conformationally constrained glycosylated amino acids. *J. Org. Chem.* **66**, 2318–2326 (2001).
222. de Andrade, V. & de Mattos, M. New reagents and synthetic approaches to the Appel reaction. *Curr. Org. Synth.* **12**, 309–327 (2015).
223. van Kalker, H. A., van Delft, F. L. & Rutjes, F. P. J. T. Catalytic Appel reactions. *Pure Appl. Chem.* **85**, 817–828 (2013).
224. Malkoch, M. *et al.* Structurally diverse dendritic libraries: A highly efficient functionalization approach using click chemistry. *Macromolecules.* **38**, 3663–3678 (2005).
225. Shaikh, T. M. & Sudalai, A. Enantioselective synthesis of (+)- α -conhydrine and (-)-sedamine by L-proline catalysed α -aminoxylation. *European J. Org. Chem.* 3437–3444 (2010).
226. Majorek, K. A. *et al.* Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–82 (2012).
227. Mercader, J. V., Abad-somovilla, A., Agullo, C. & Abad-Fuentes, A. Fluxapyroxad haptens and antibodies for highly sensitive immunoanalysis of food samples. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 9333–9341 (2017).
228. Stein, P. E., Leslie, A. G. W., Finch, J. T. & Carrell, R. W. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **221**, 941–959 (1991).
229. Welinder, K. G., Smillie, L. B. & Schonbaum, G. R. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. I. Tryptic peptides. *Can. J. Biochem.* **50**, 44–62 (1972).
230. Aime, S., Dastrù, W., Gobetto, R. & Viale, A. para-Hydrogenation of unsaturated moieties on poly(lysine) derived substrates for the development of novel hyperpolarized MRI contrast agents. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3948 (2005).
231. Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C. & Finn, M. G. Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 9879–9883 (2009).
232. Presolski, S. I., Hong, V. P. & Finn, M. G. Copper-catalyzed azide-alkyne click chemistry for bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **3**, 153–162 (2011).
233. Manclús, J. J. & Montoya, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. 1. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3703–3709 (1996).
234. Suárez-Pantaleón, C., Mercader, J. V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A. & Abad-Fuentes, A. Forchlorfenuron-mimicking haptens: From immunogen design to antibody characterization by hierarchical clustering analysis. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 4863–4872 (2011).
235. Galvidis, I. A., Wang, Z., Nuriev, R. I. & Burkin, M. A. Broadening the detection spectrum of small analytes using a two-antibody-designed hybrid immunoassay. *Anal. Chem.* **90**, 4901–4908 (2018).
236. Anfossi, L. *et al.* A lateral flow immunoassay for the rapid detection of ochratoxin A in wine and grape must. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11491–11497 (2012).
237. Serra, R., Mendonça, C., Abrunhosa, L., Pietri, A. & Venâncio, A. Determination of ochratoxin A in wine grapes: Comparison of extraction procedures and method validation. *Anal. Chim. Acta.* **513**, 41–47 (2004).
238. Magalhães, P. J. *et al.* Isolation of phenolic compounds from hop extracts using

- polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1217**, 3258–3268 (2010).
239. Gil, M. *et al.* Rosé wine fining using polyvinylpolypyrrolidone: colorimetry, targeted polyphenomics, and molecular dynamics simulations. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 10591–10597 (2017).
240. Robinson, A. L., Lee, H. J. & Ryu, D. Polyvinylpolypyrrolidone reduces cross-reactions between antibodies and phenolic compounds in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ochratoxin A. *Food Chem.* **214**, 47–52 (2017).
241. Kaur, J. *et al.* Immunochromatographic dipstick assay format using gold nanoparticles labeled protein-hapten conjugate for the detection of atrazine. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5028–5036 (2007).
242. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* **9**, 671–675 (2012).
243. COMMISSION REGULATION (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis.
244. Lattanzio, V. M. T., Ciasca, B., Powers, S. & von Holst, C. Validation of screening methods according to Regulation 519/2014/EU. Determination of deoxynivalenol in wheat by lateral flow immunoassay: A case study. *Trends Analyt. Chem.* **76**, 137–144 (2016).
245. Lattanzio, V. M. T. Toward harmonization of performance criteria for mycotoxin screening methods: The eu perspective. *J. AOAC Int.* **99**, 906–913 (2016).
246. Armarego, W. L. F. & Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth Heinemann Press: Oxford **4th Ed**, (1996).
247. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.
248. REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
249. LEY 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
250. Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548–1550 (1979).
251. Nowinski, R. C., Lostrom, M. E., Tam, M. R., Stone, M. R. & Burnette, W. N. The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses. *Virology* **93**, 111–126 (1979).
252. Raab, G. M. Comparison of a logistic and a mass-action curve for radioimmunoassay data. *Clin. Chem.* **29**, 1757–1761 (1983).
253. Okano, K., Okuyama, K. I., Fukuyama, T. & Tokuyama, H. Mild debenylation of aryl benzyl ether with BCl₃ in the presence of pentamethylbenzene as a non-lewis-basic cation scavenger. *Synlett.* 1977–1980 (2008).

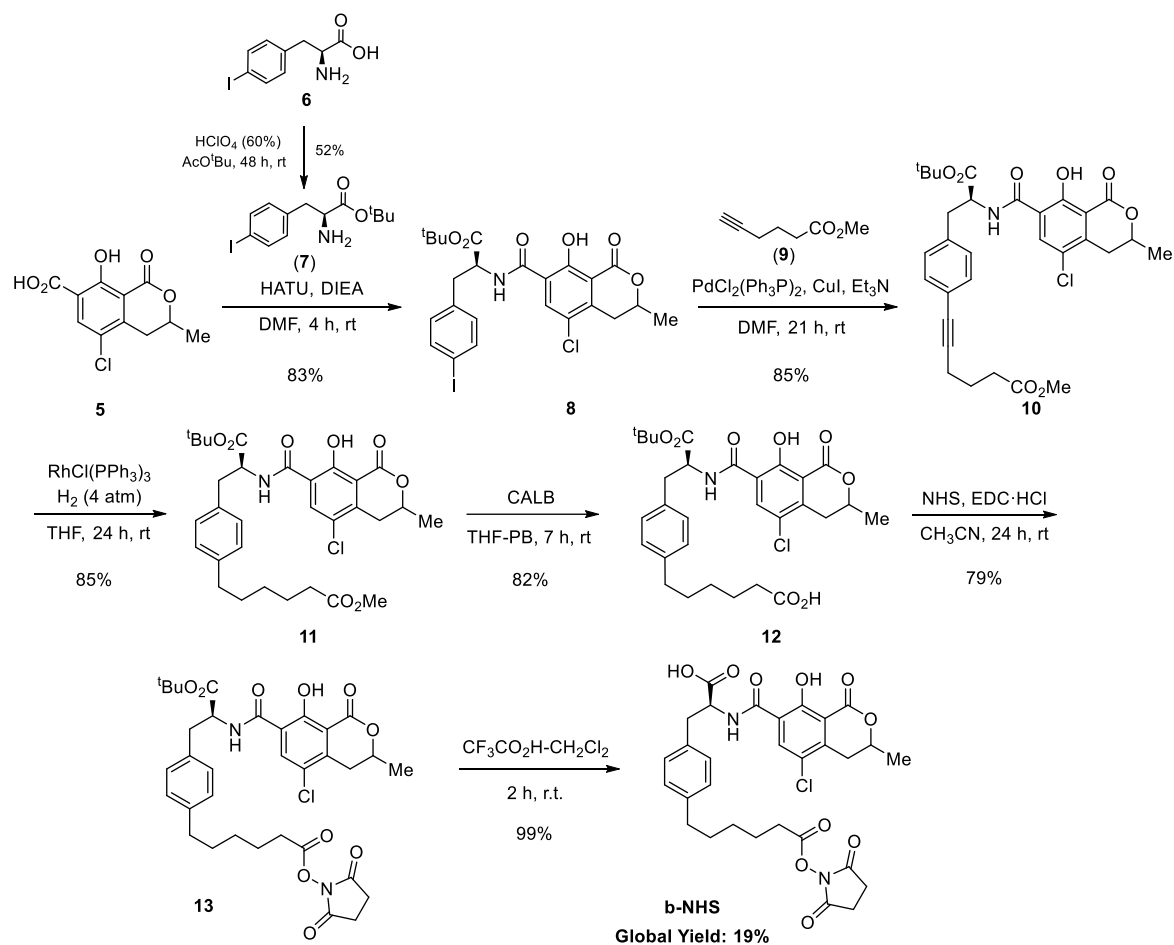
ANNEXES

A. Hapten synthesis and NMR spectra

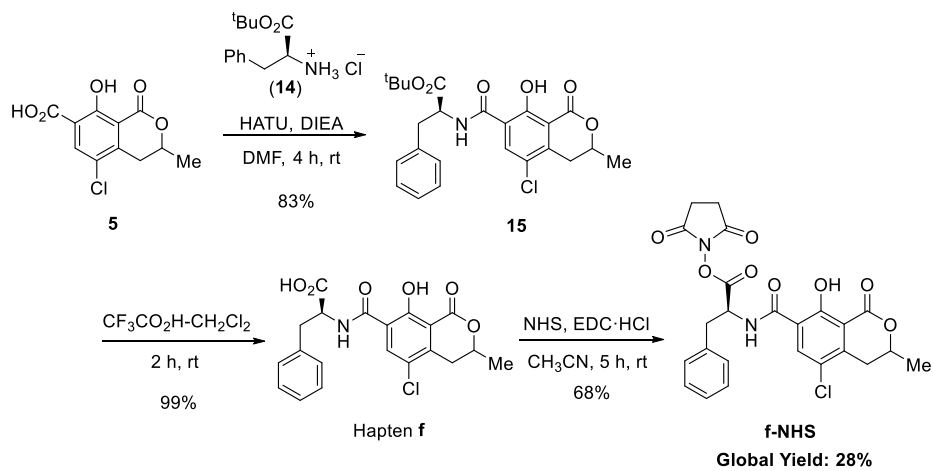
• Synthesis of Ochratoxin α (OT α)



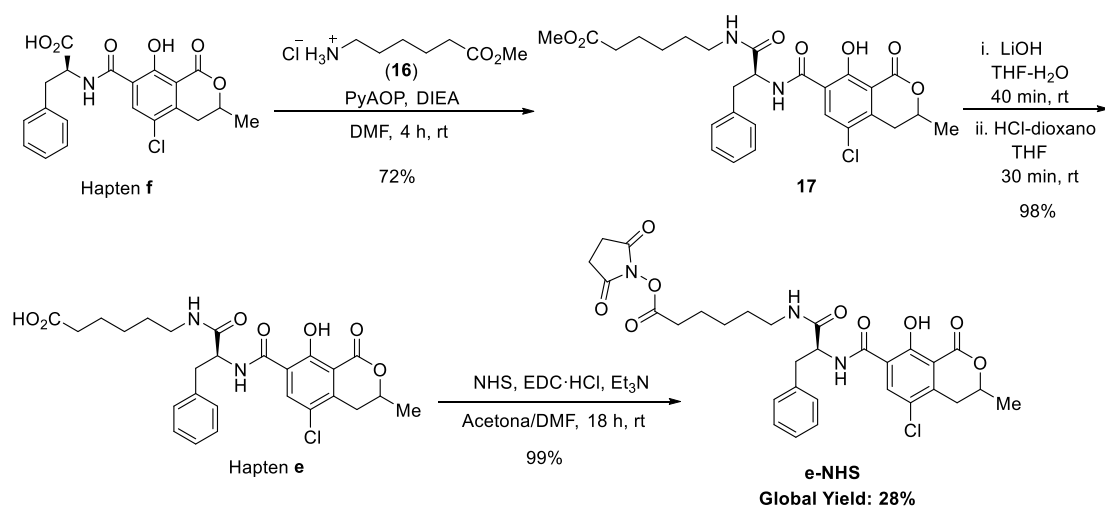
• Synthesis of Hapten b



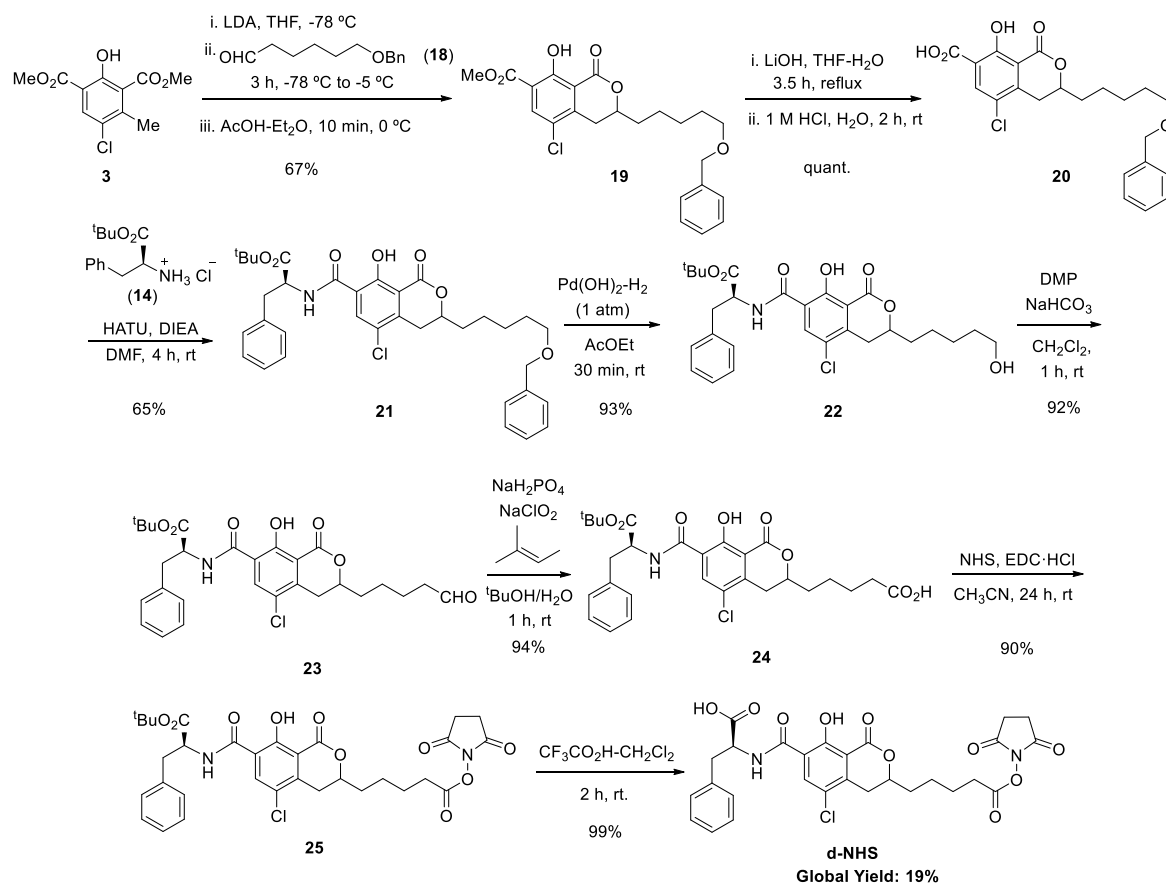
- Synthesis of Hapten f**



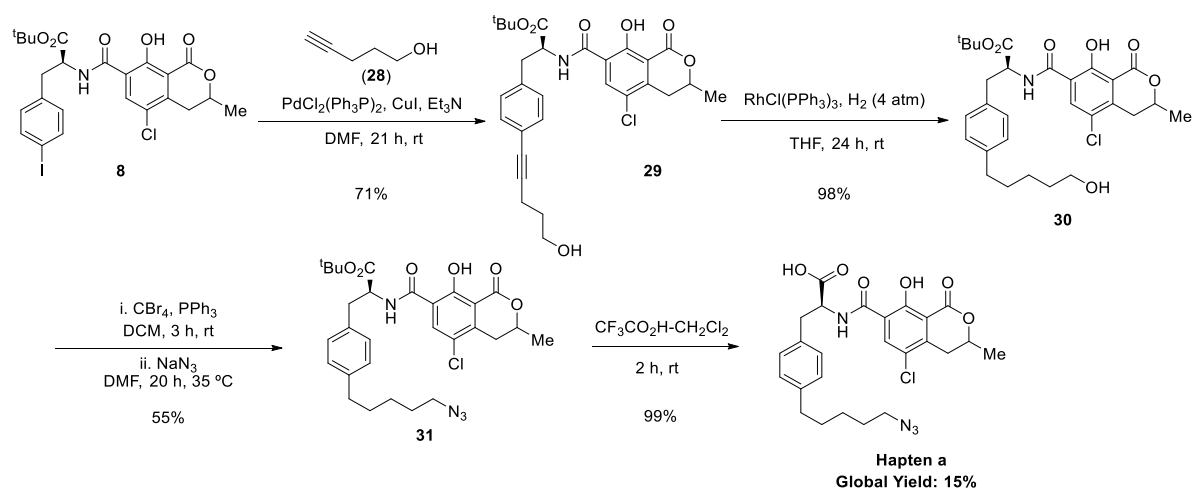
- Synthesis of Hapten e**

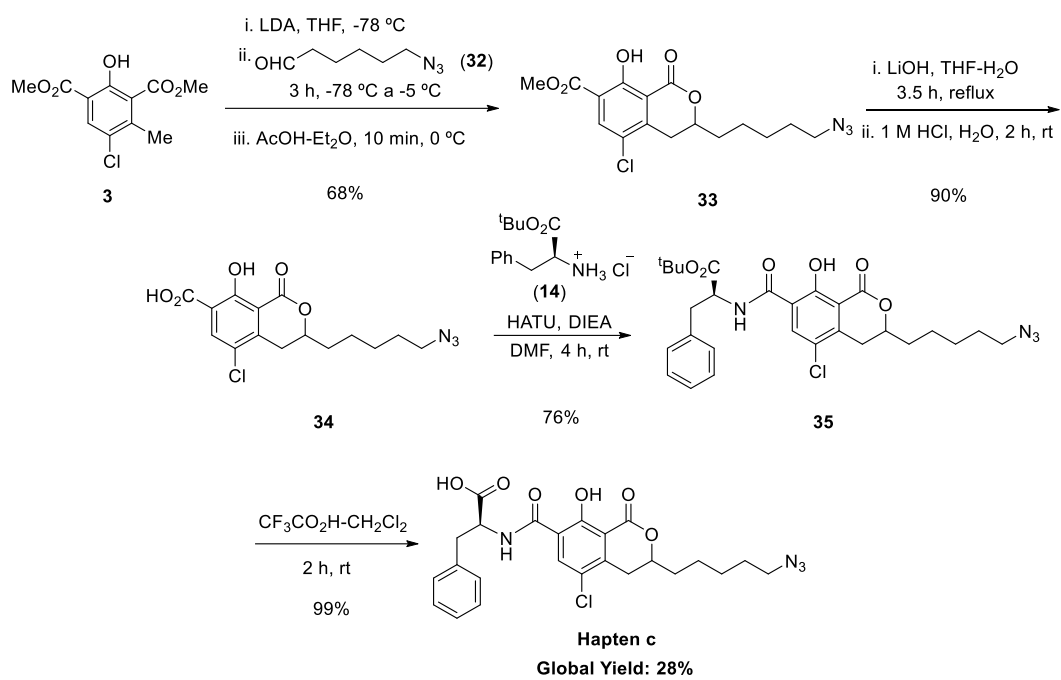


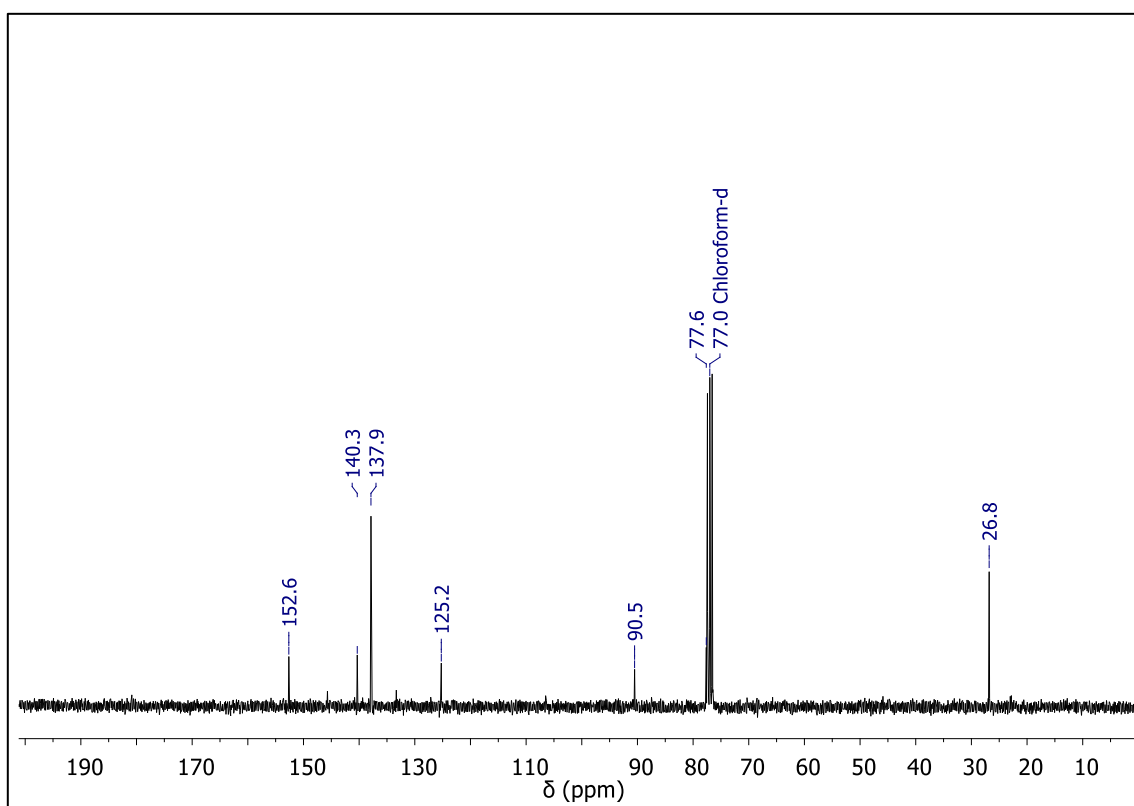
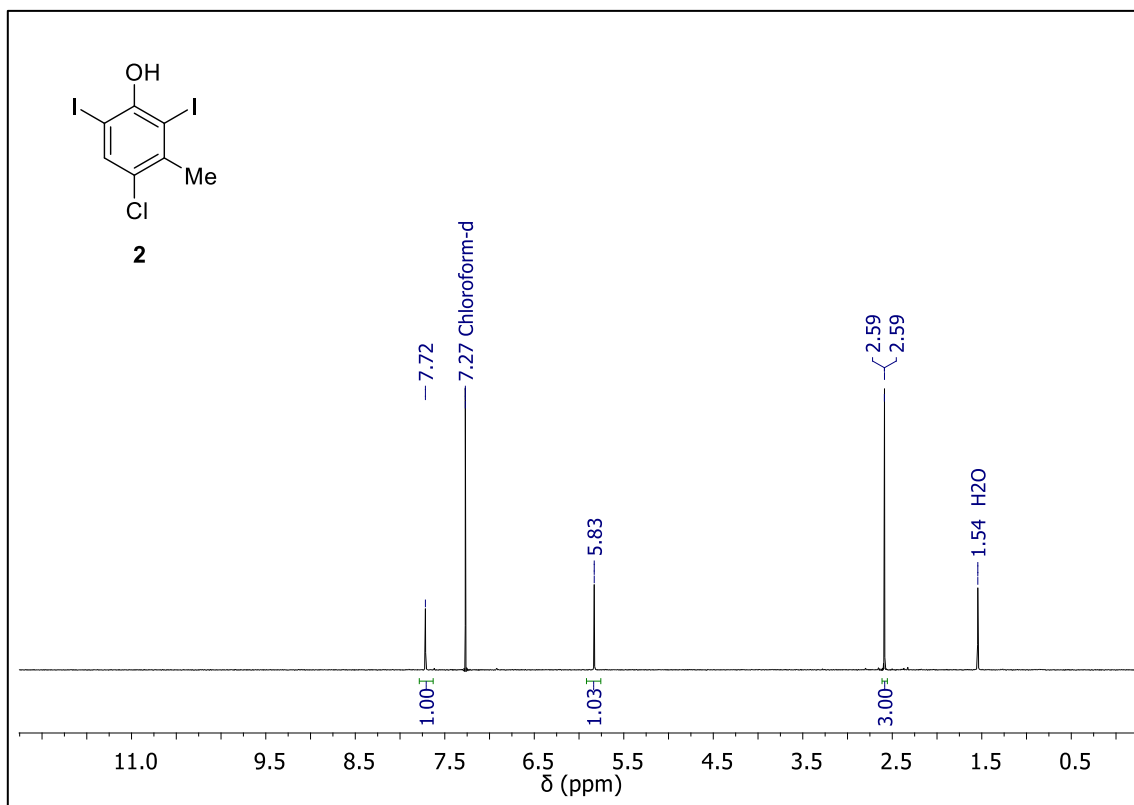
• Synthesis of Hapten d

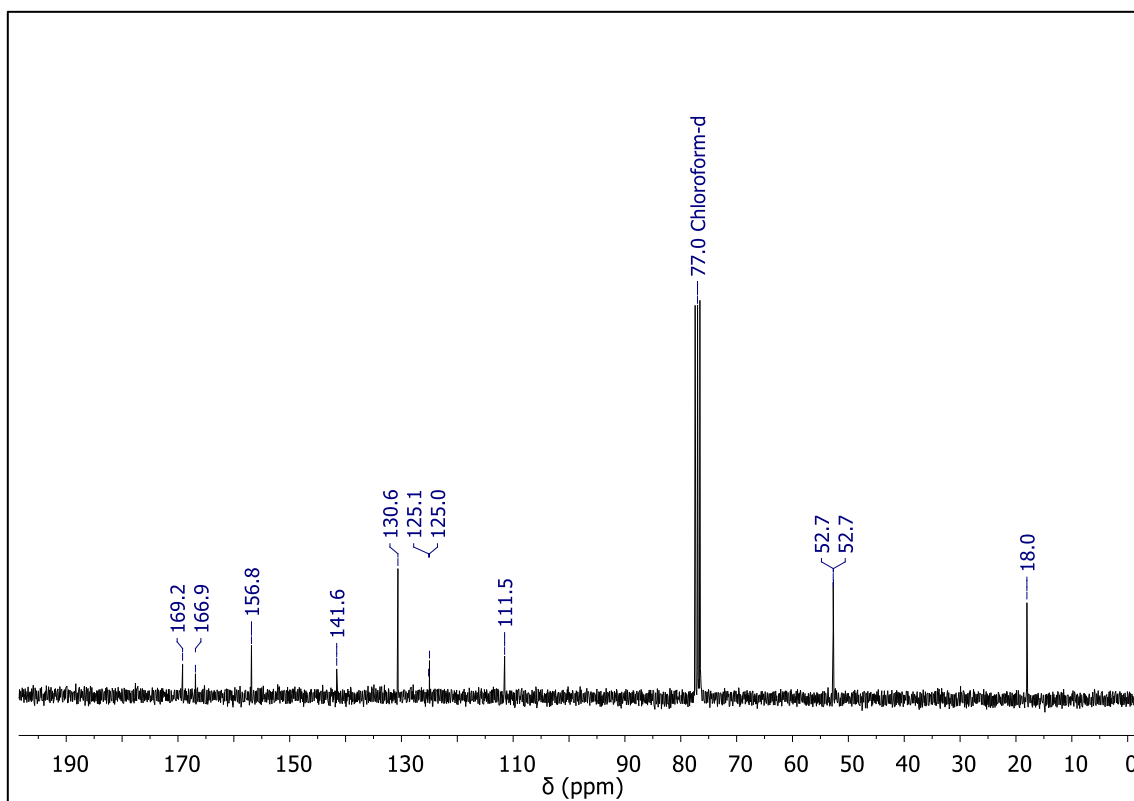
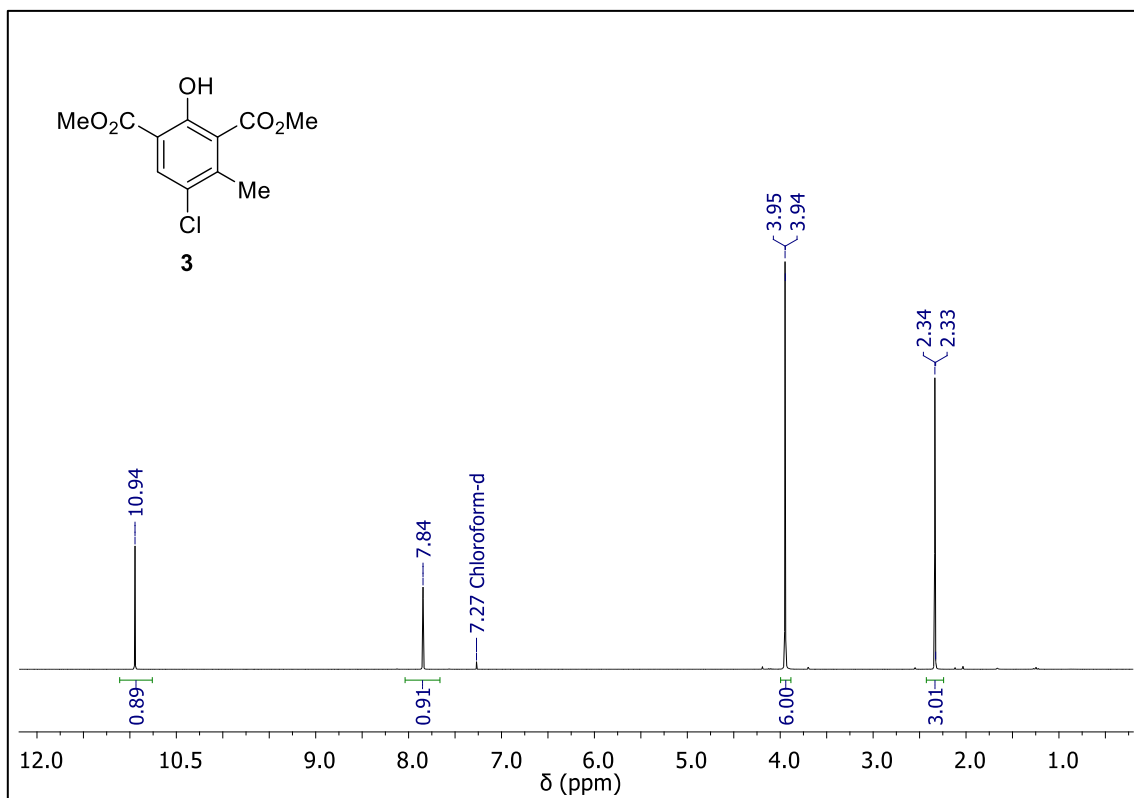


• Synthesis of Hapten a

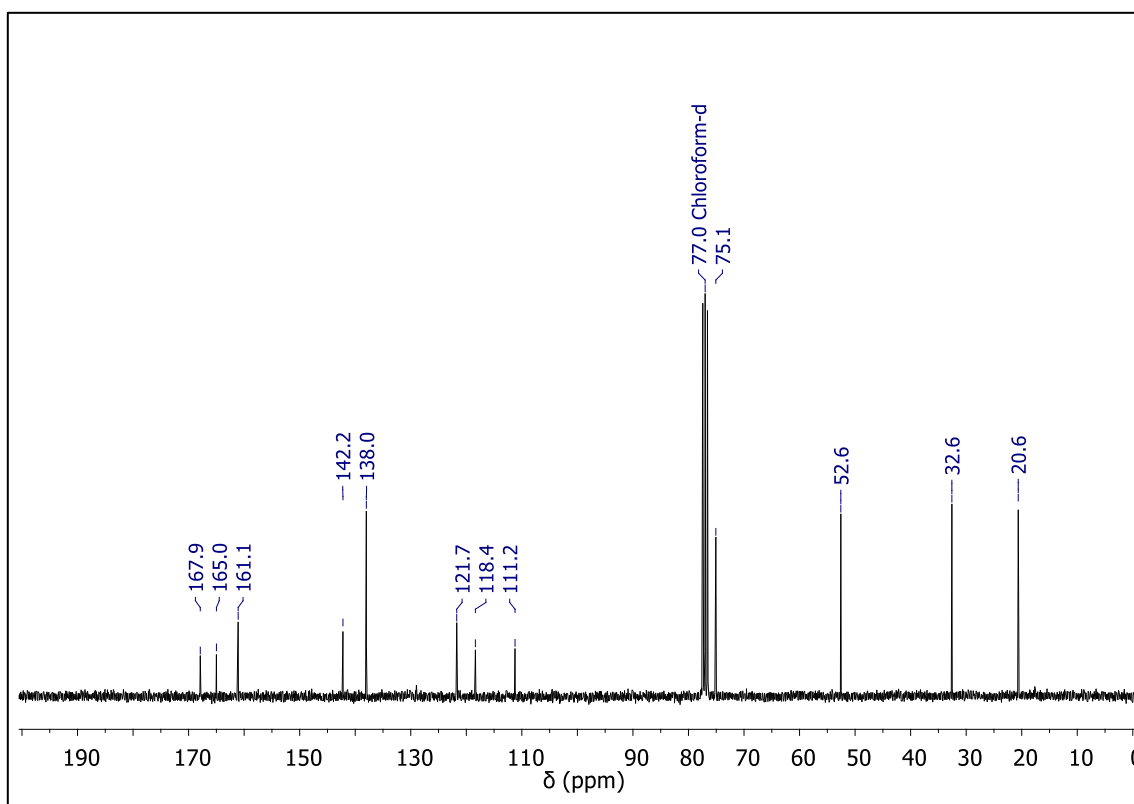
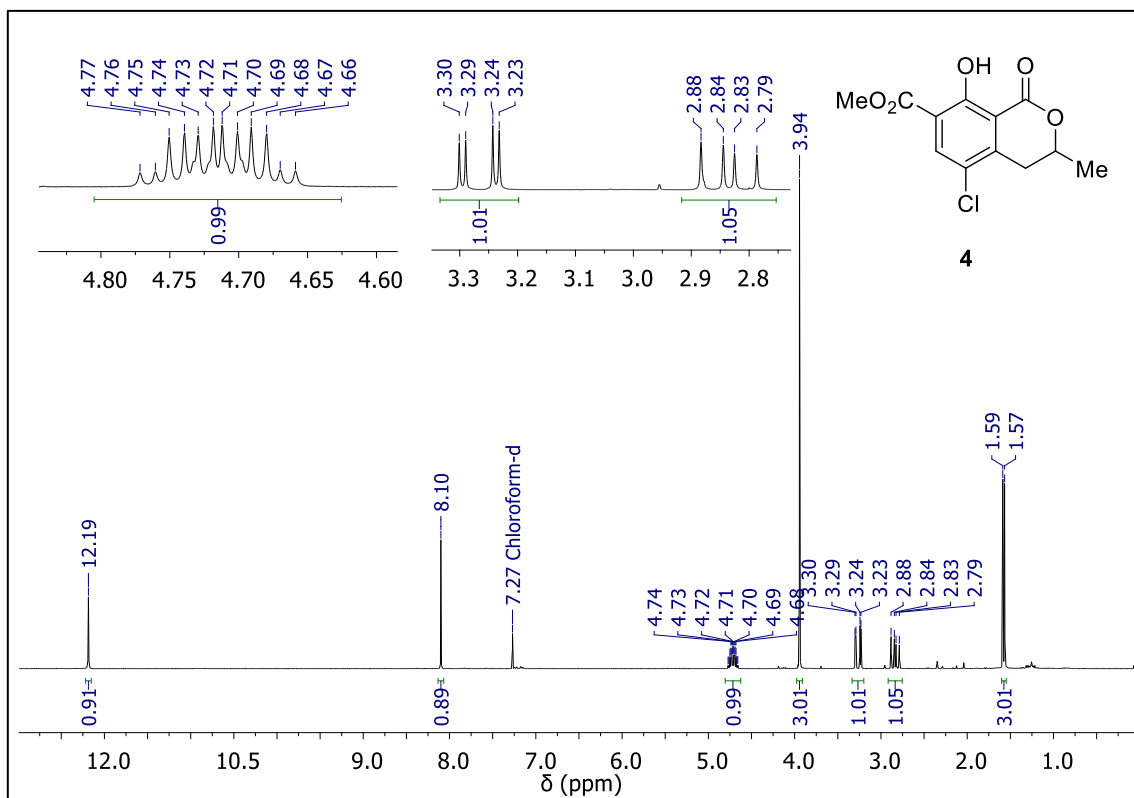


• **Synthesis of Hapten c**

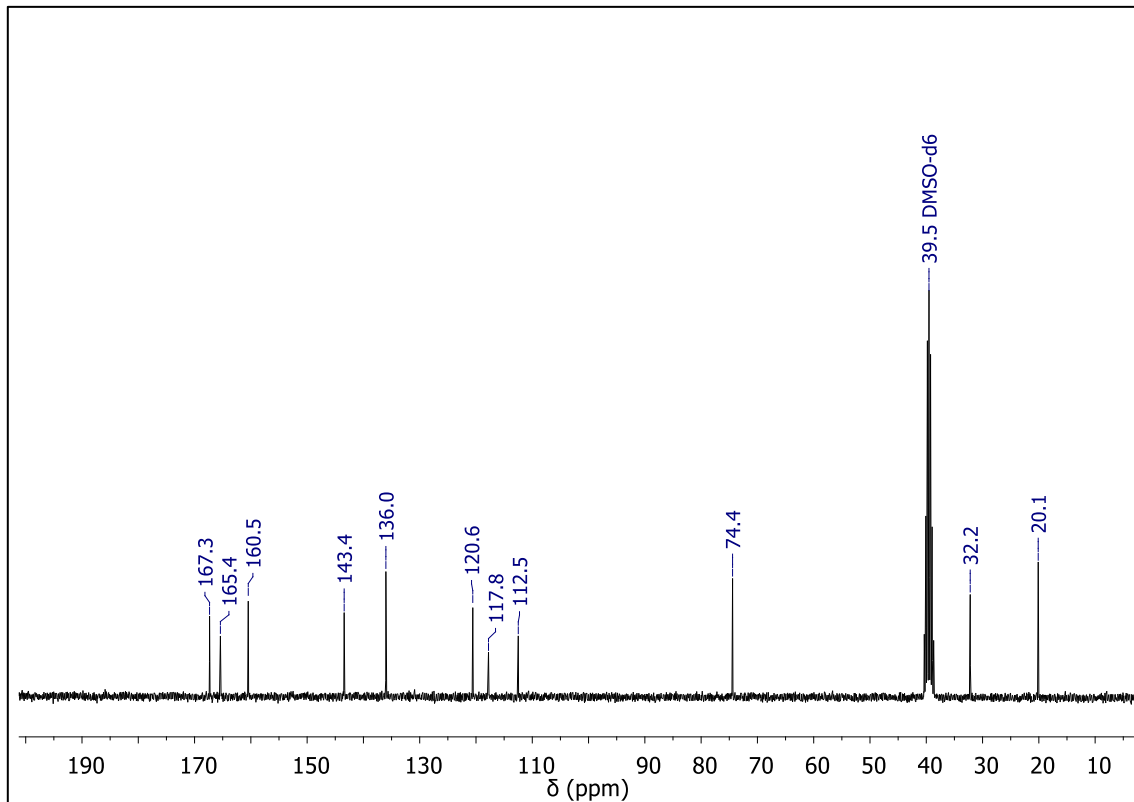
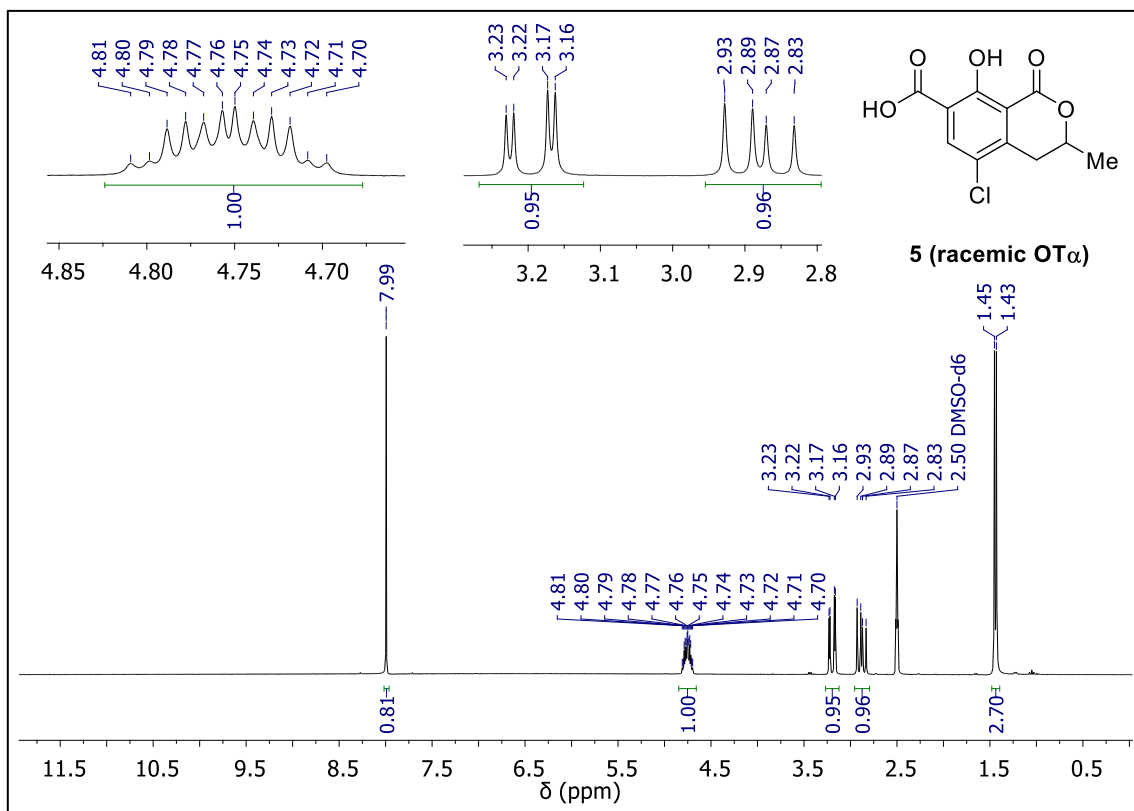
NMR spectra of intermediate **2**.

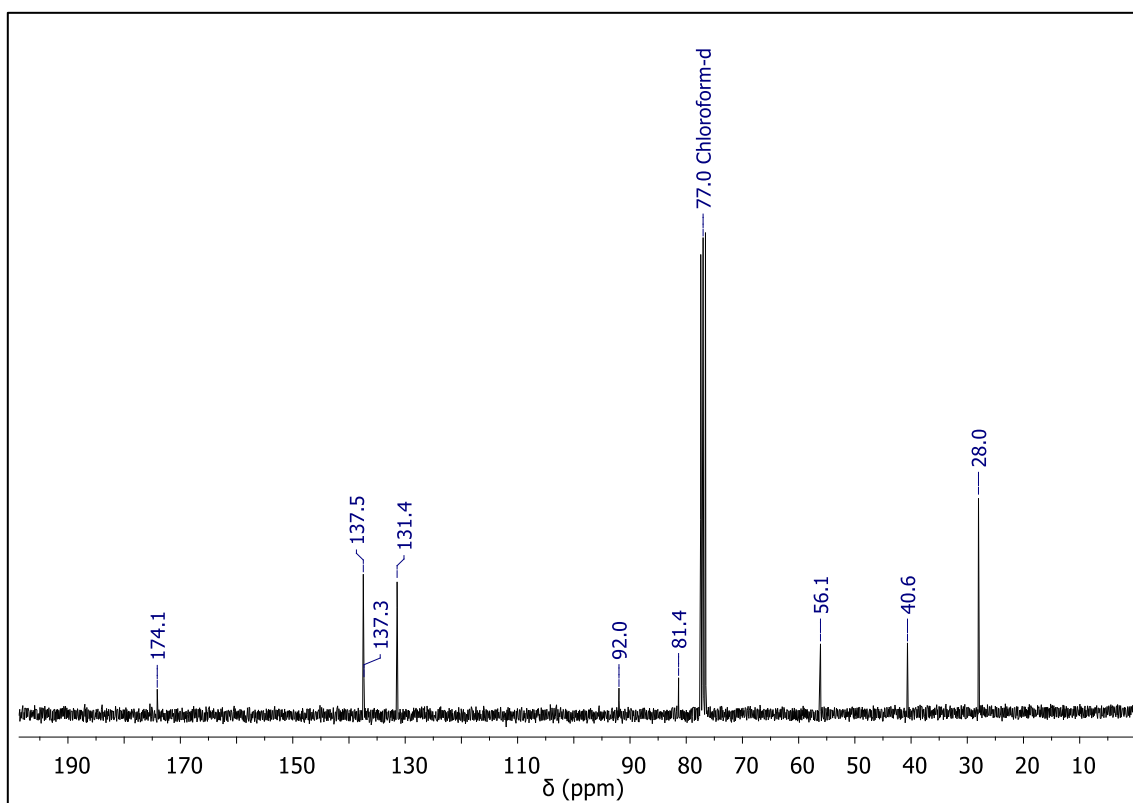
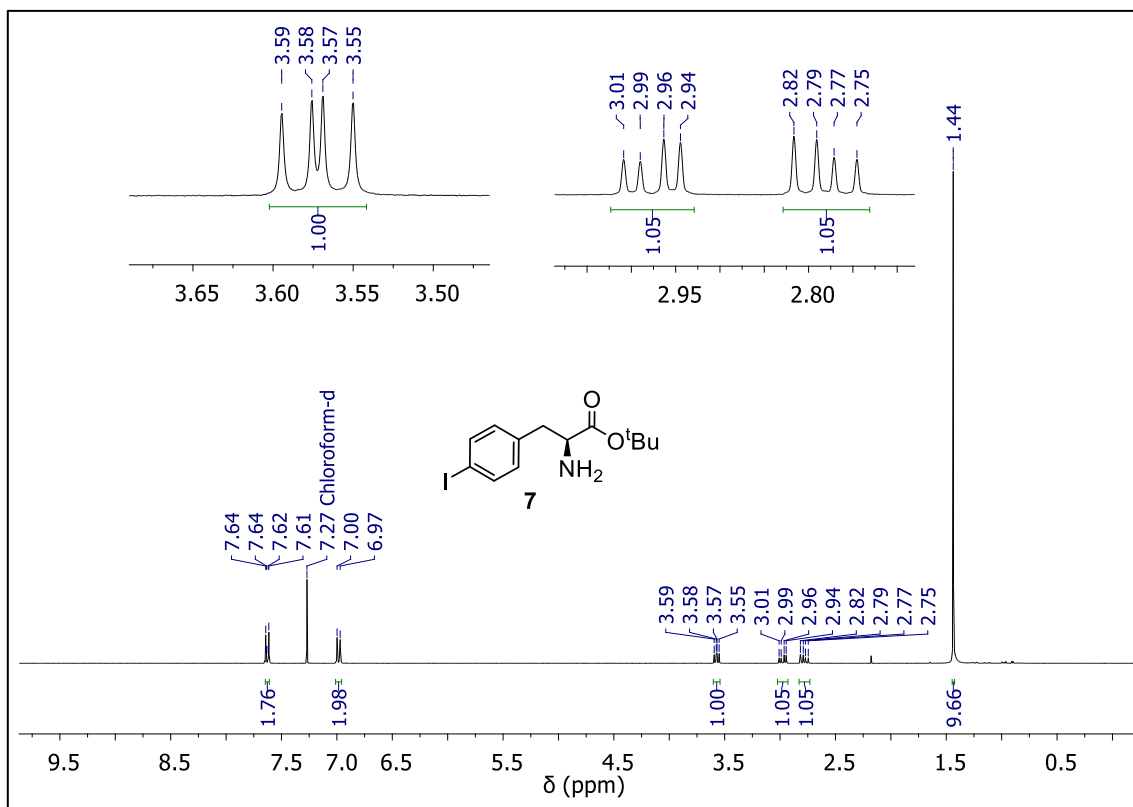
NMR spectra of intermediate **3**.

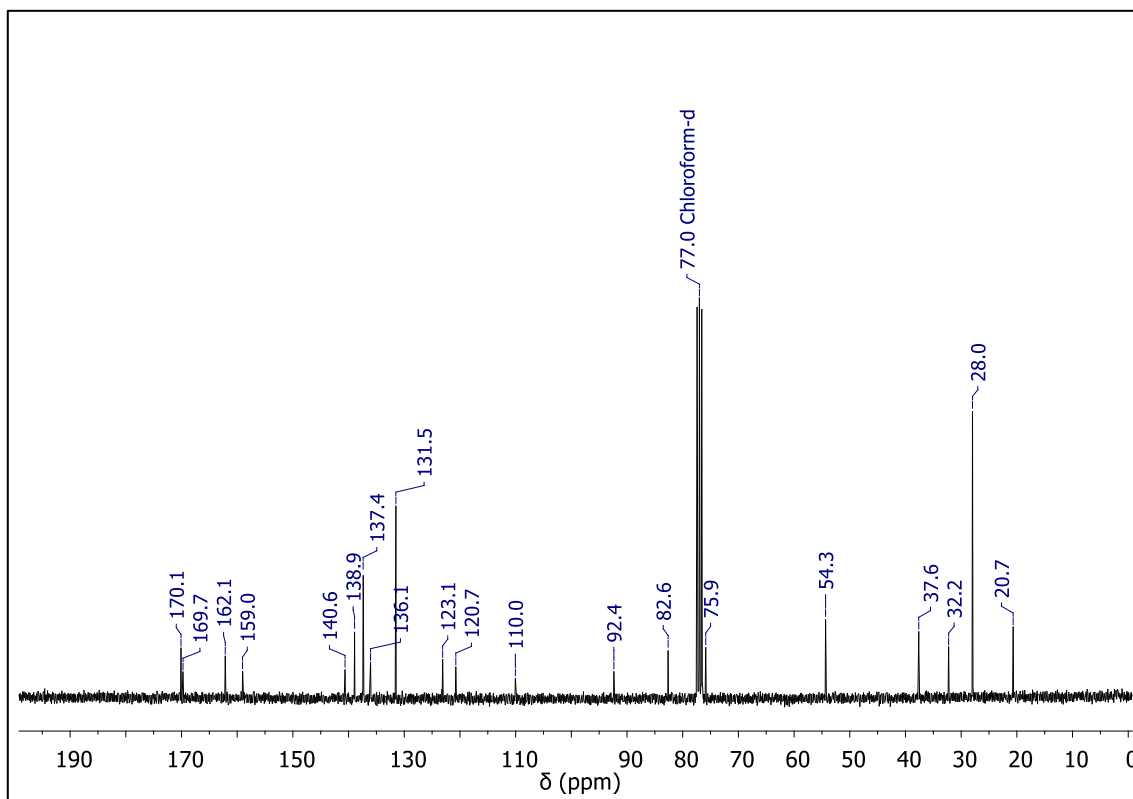
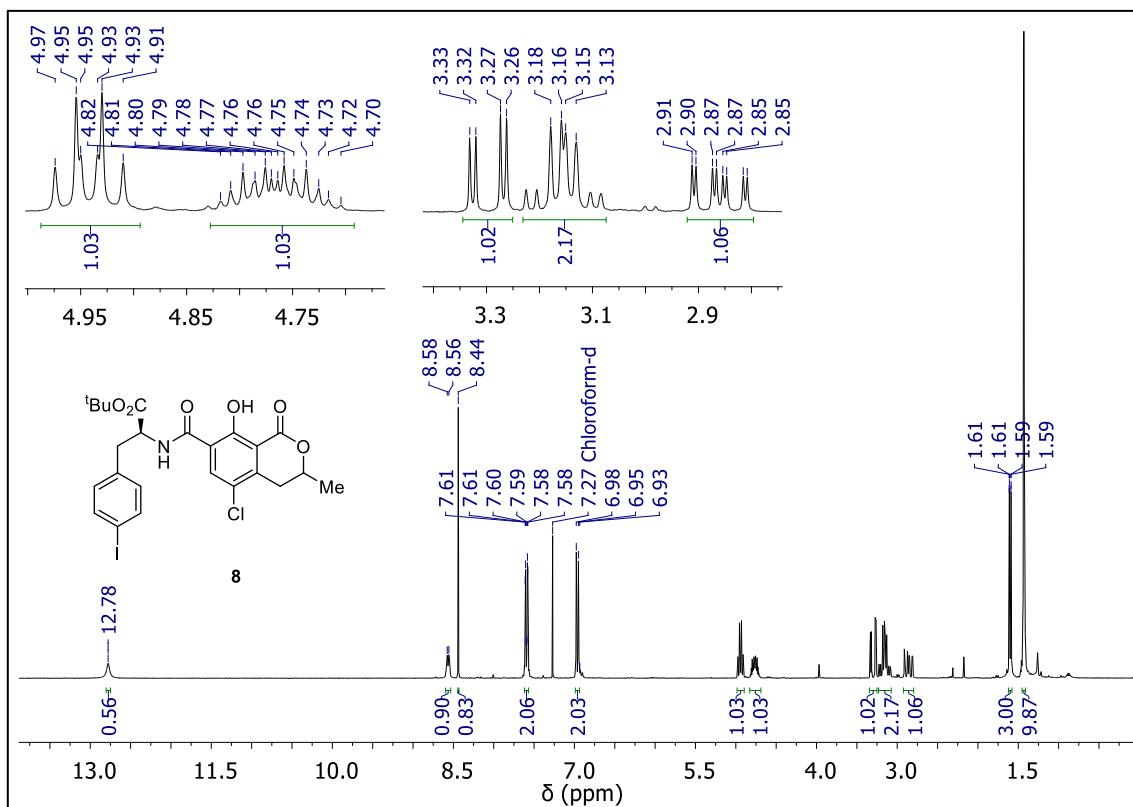
NMR spectra of intermediate 4.

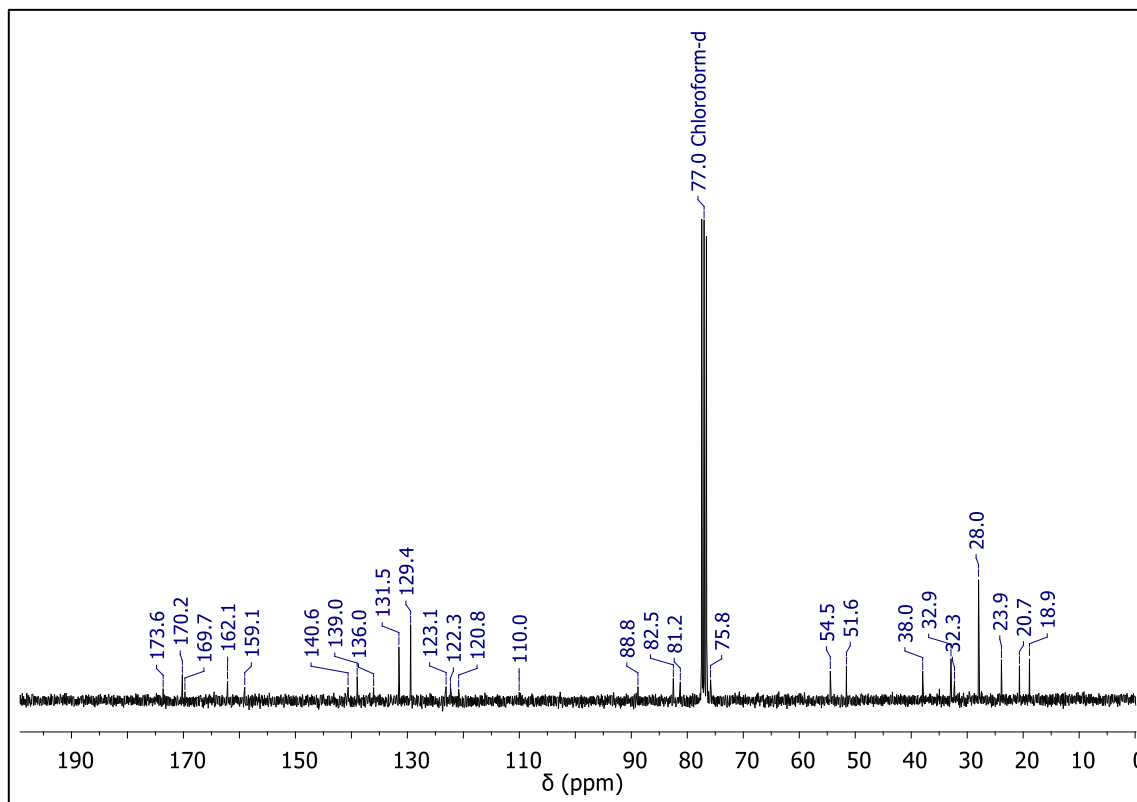
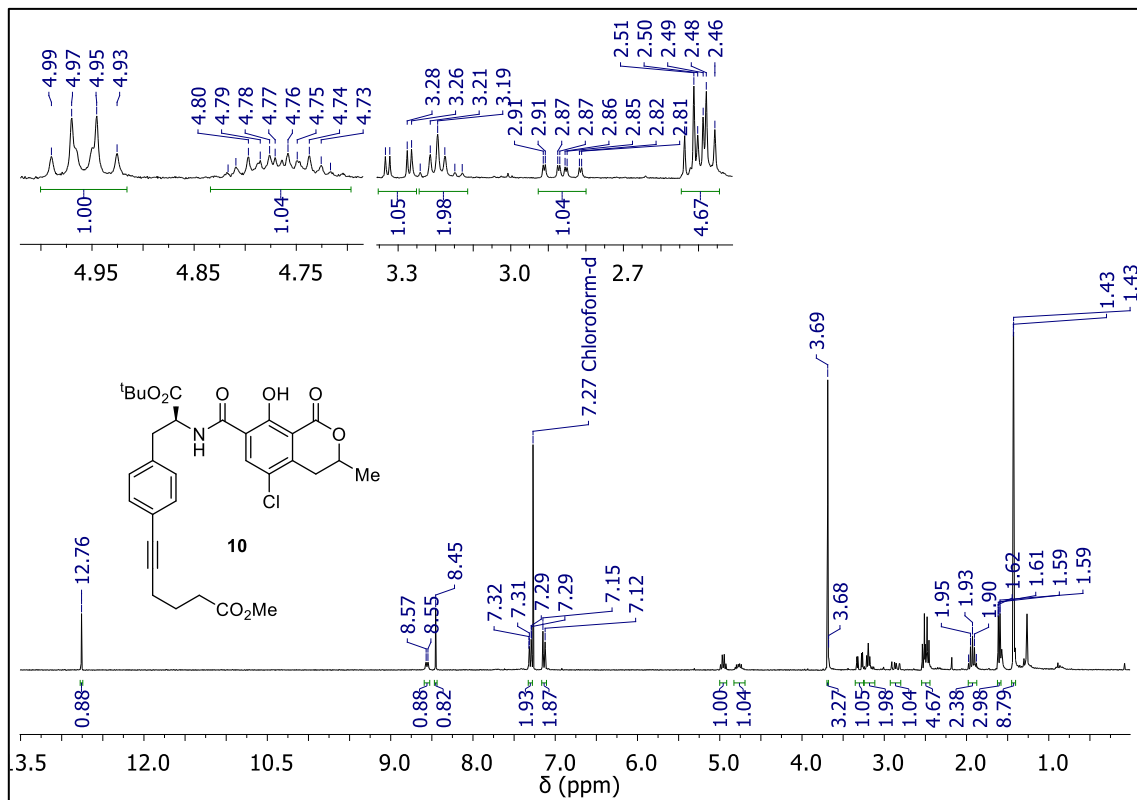


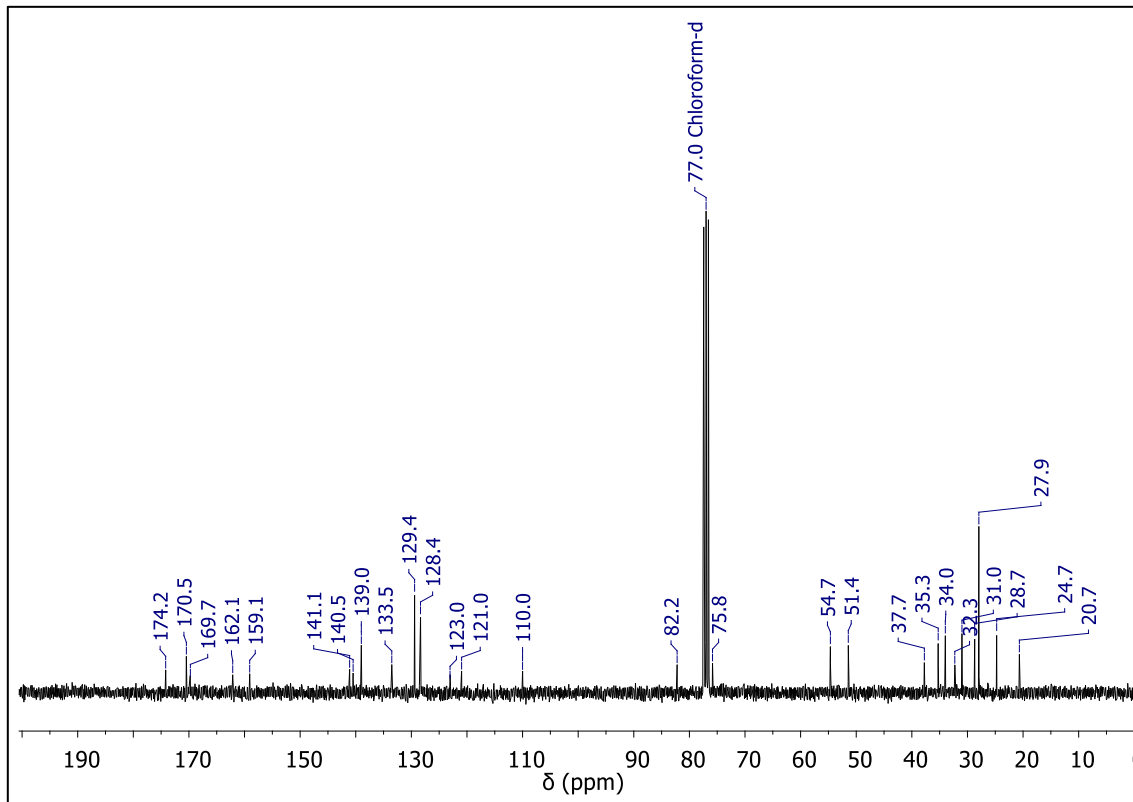
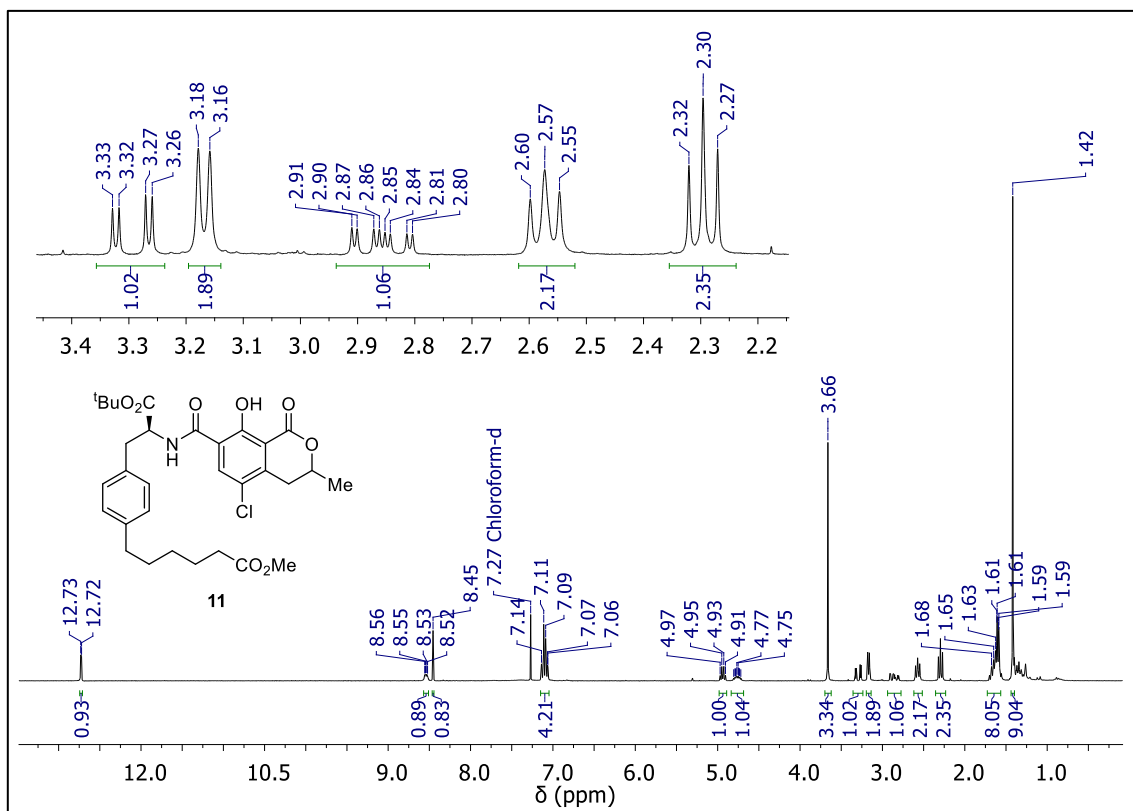
NMR spectra of intermediate 5.

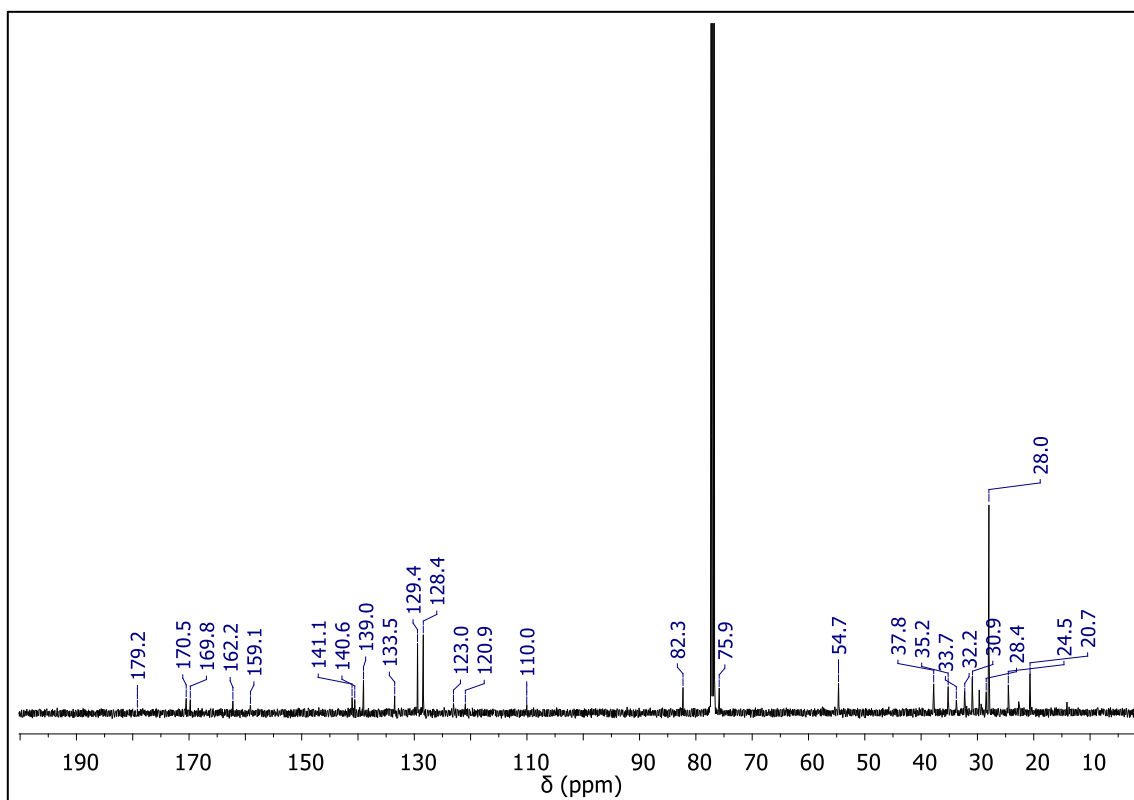
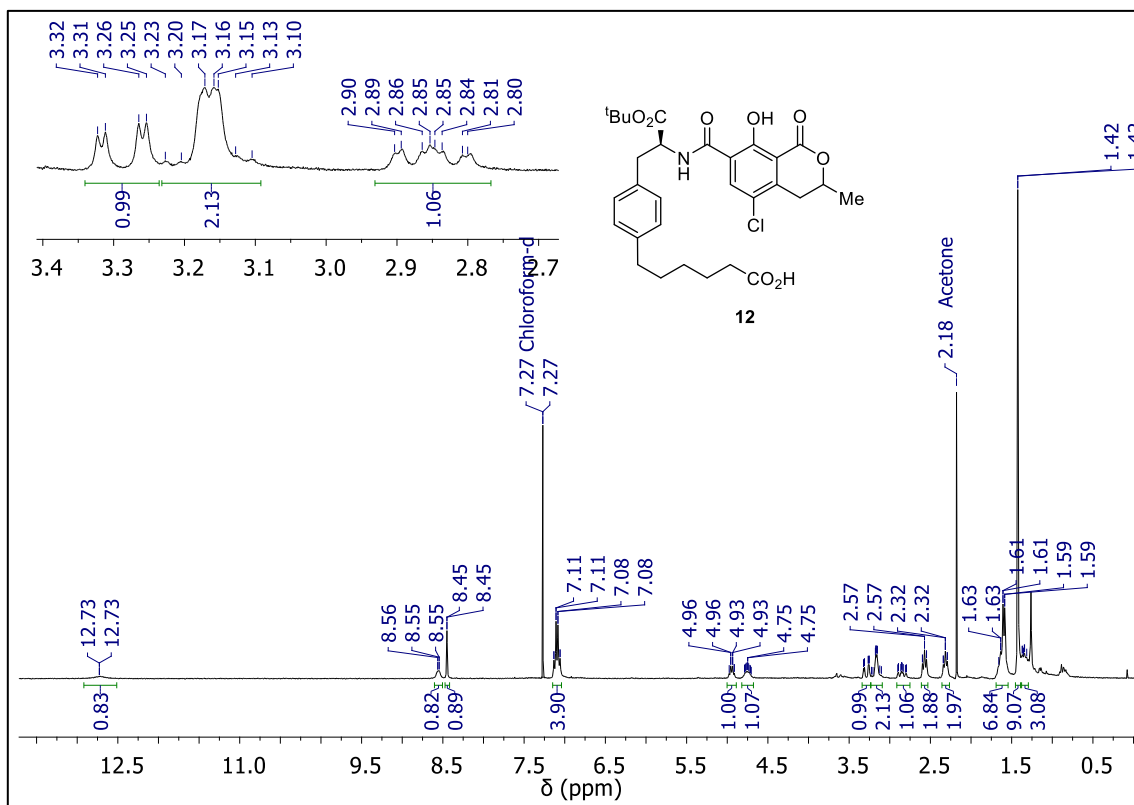


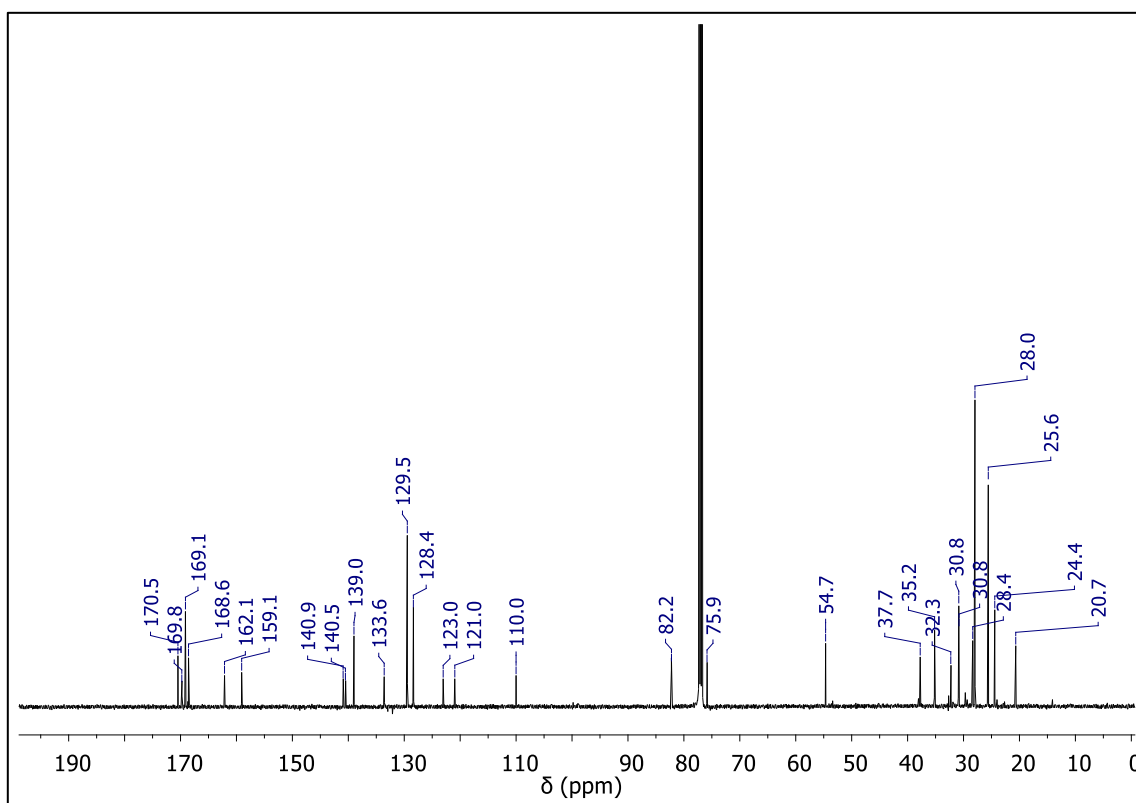
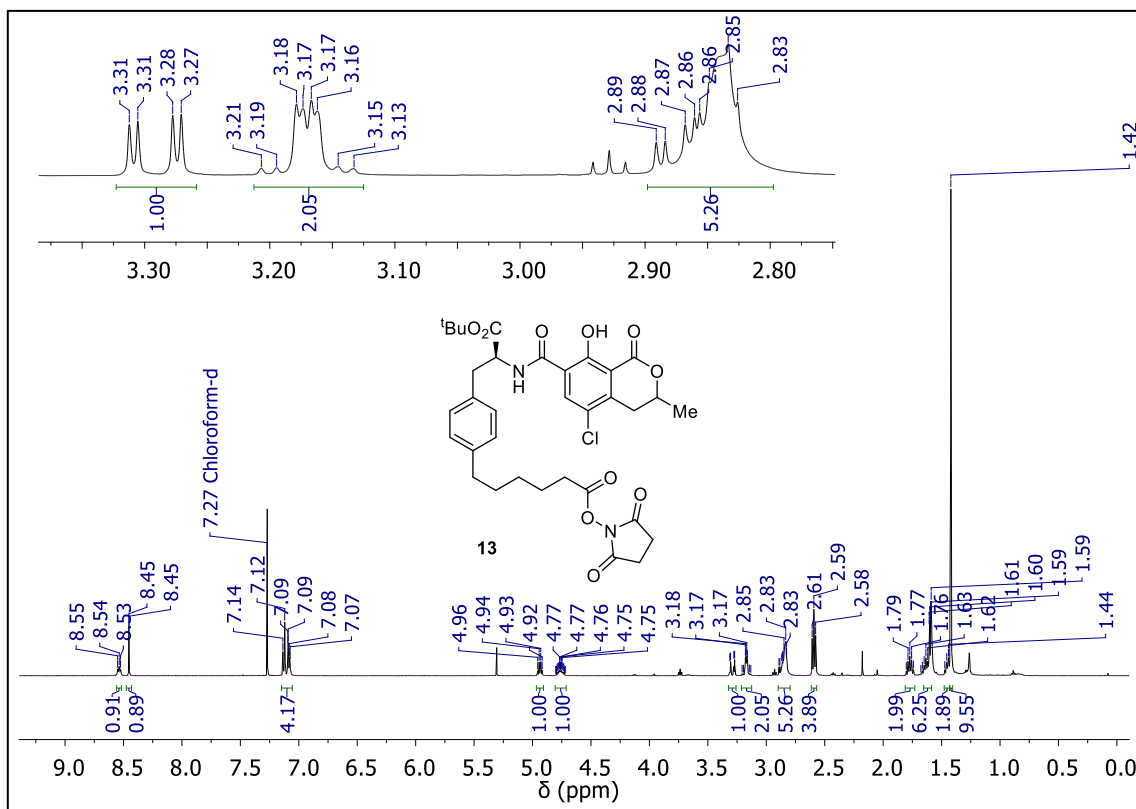
NMR spectra of intermediate **7**.

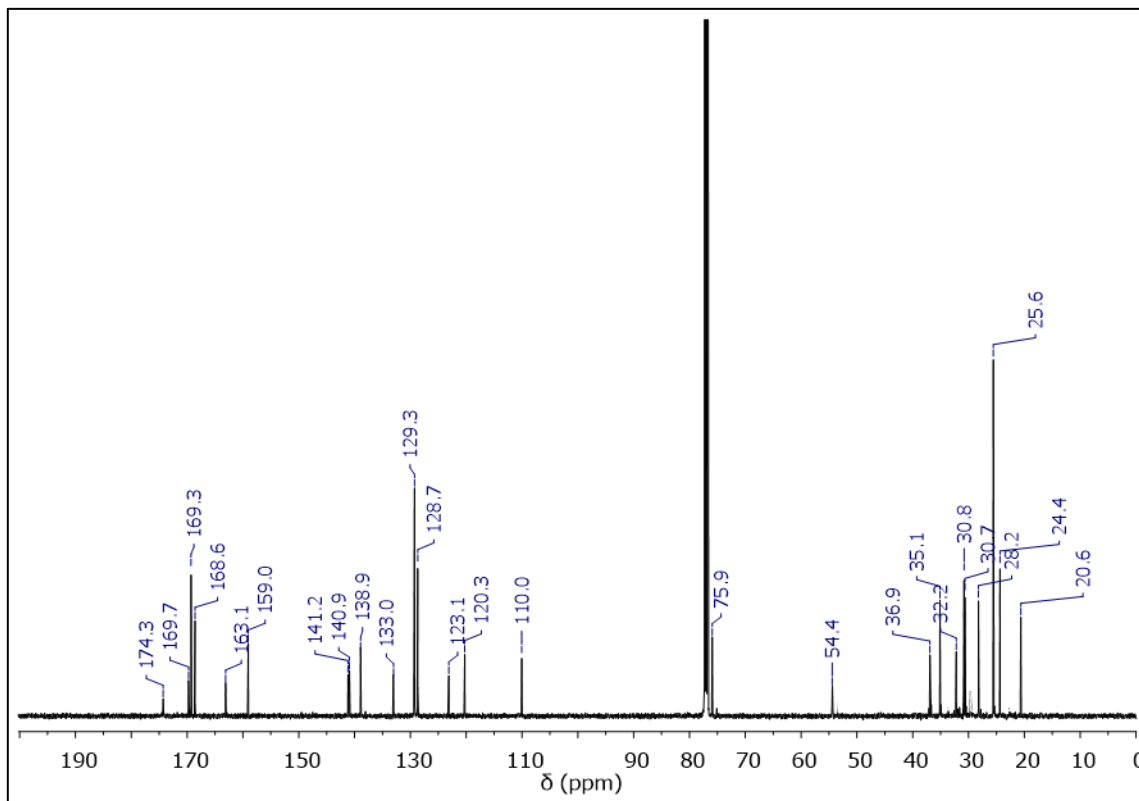
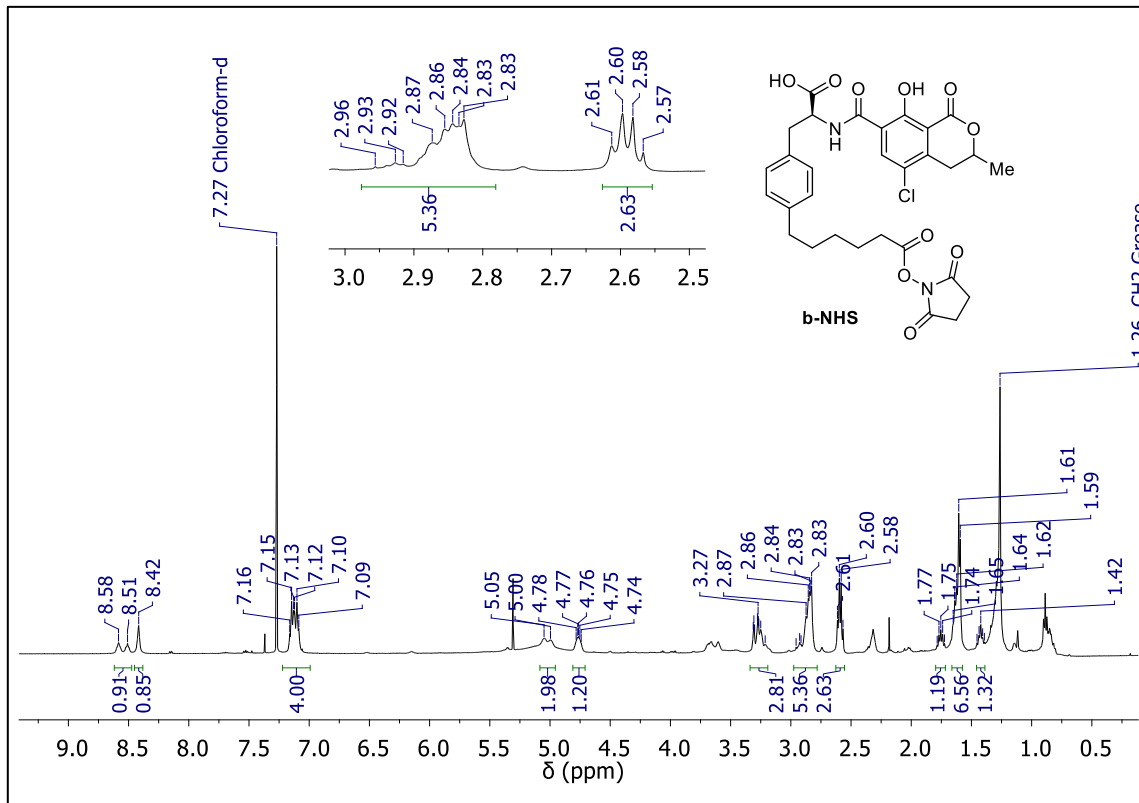
NMR spectra of intermediate **8**.

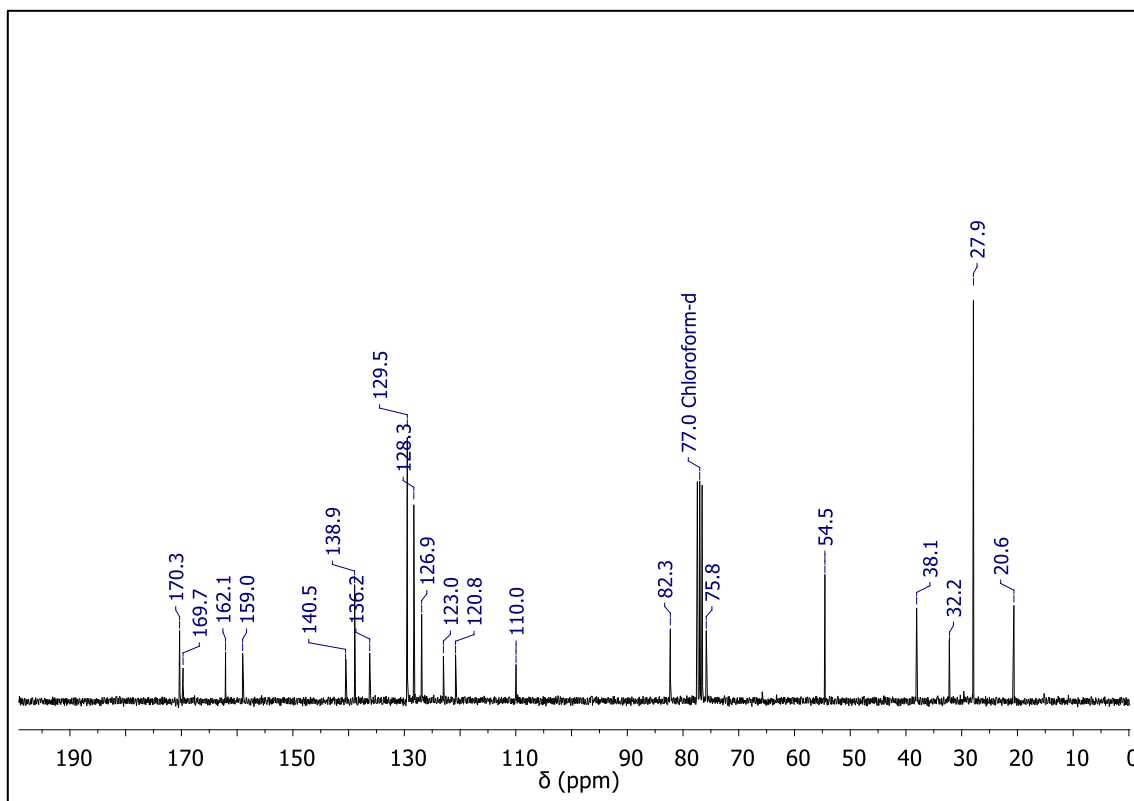
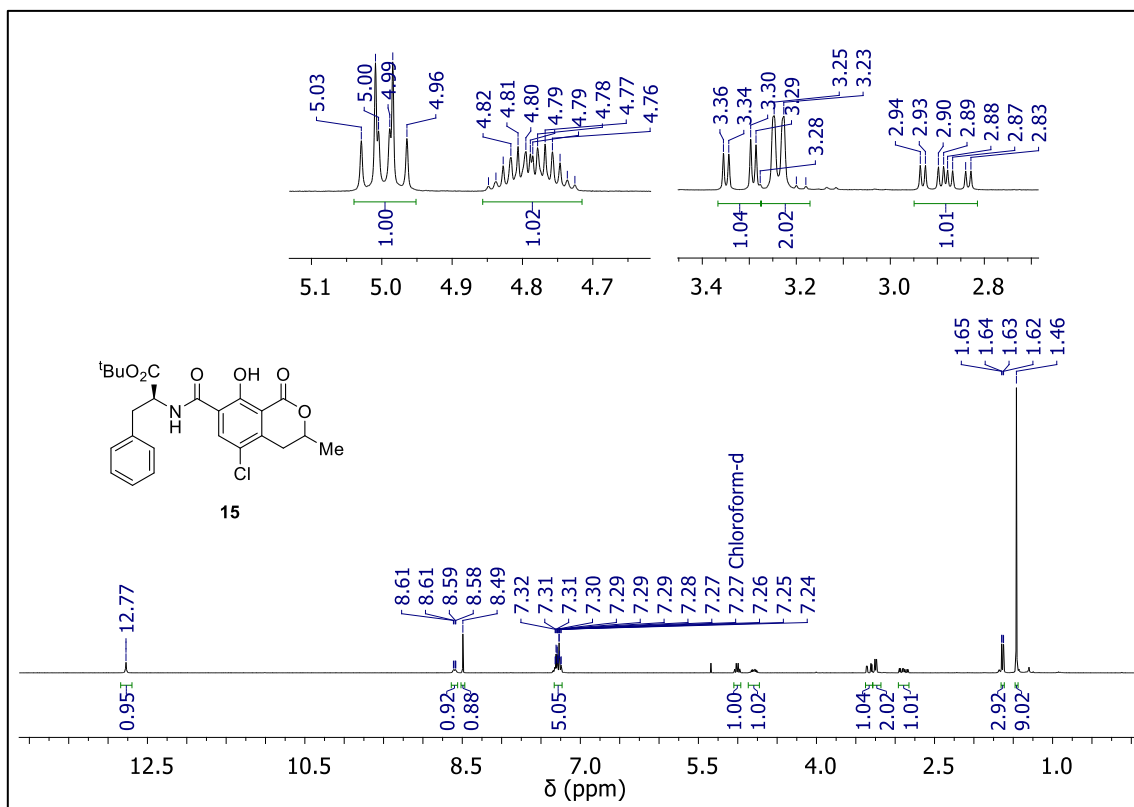
NMR spectra of intermediate **10**.

NMR spectra of intermediate **11**.

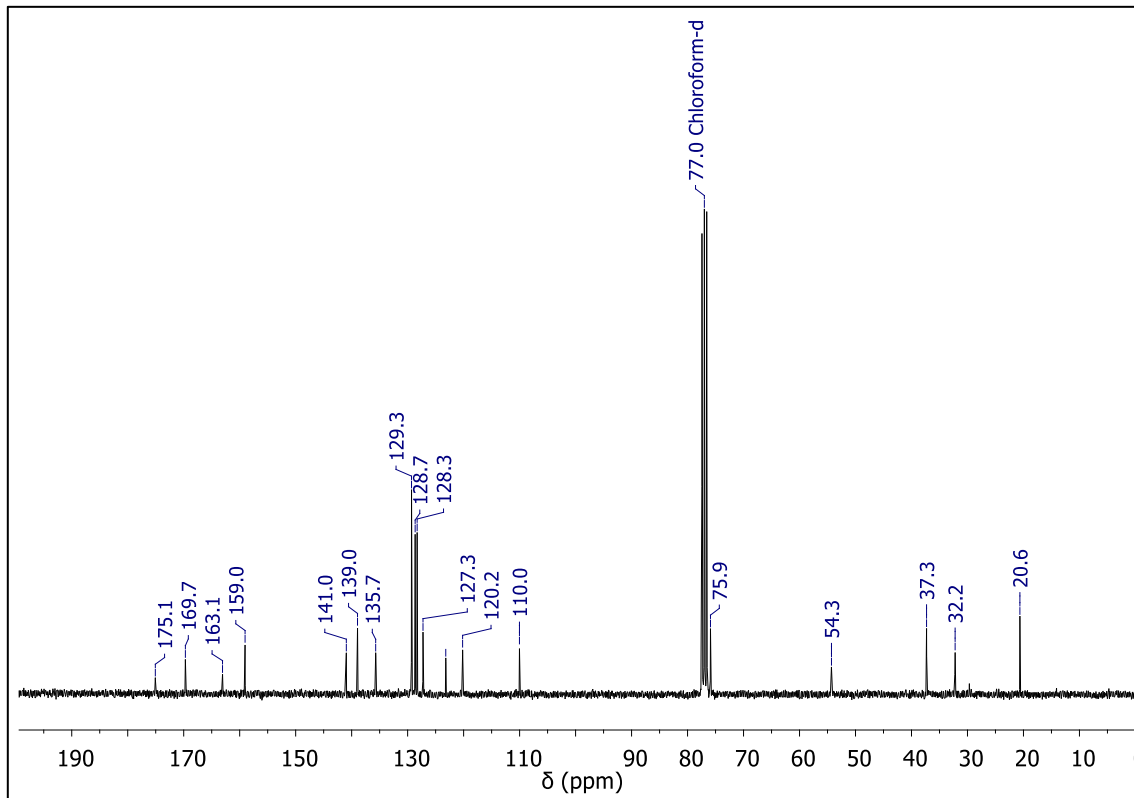
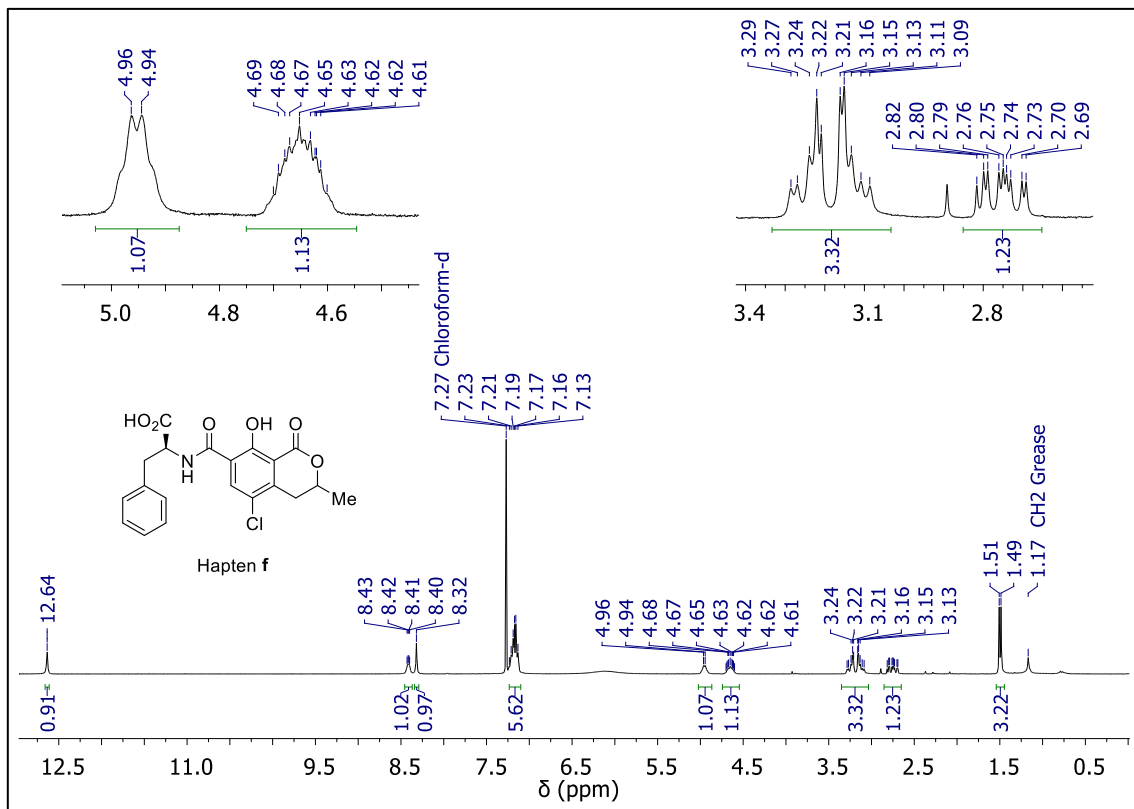
NMR spectra of intermediate **12**.

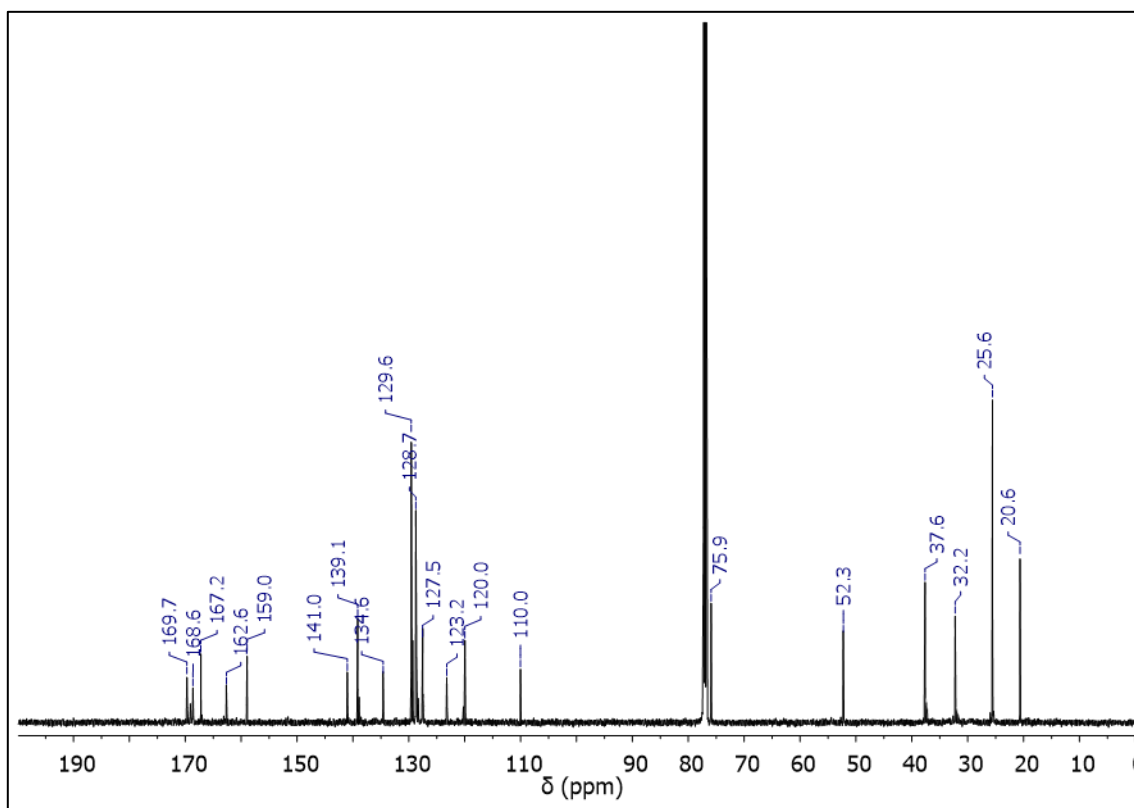
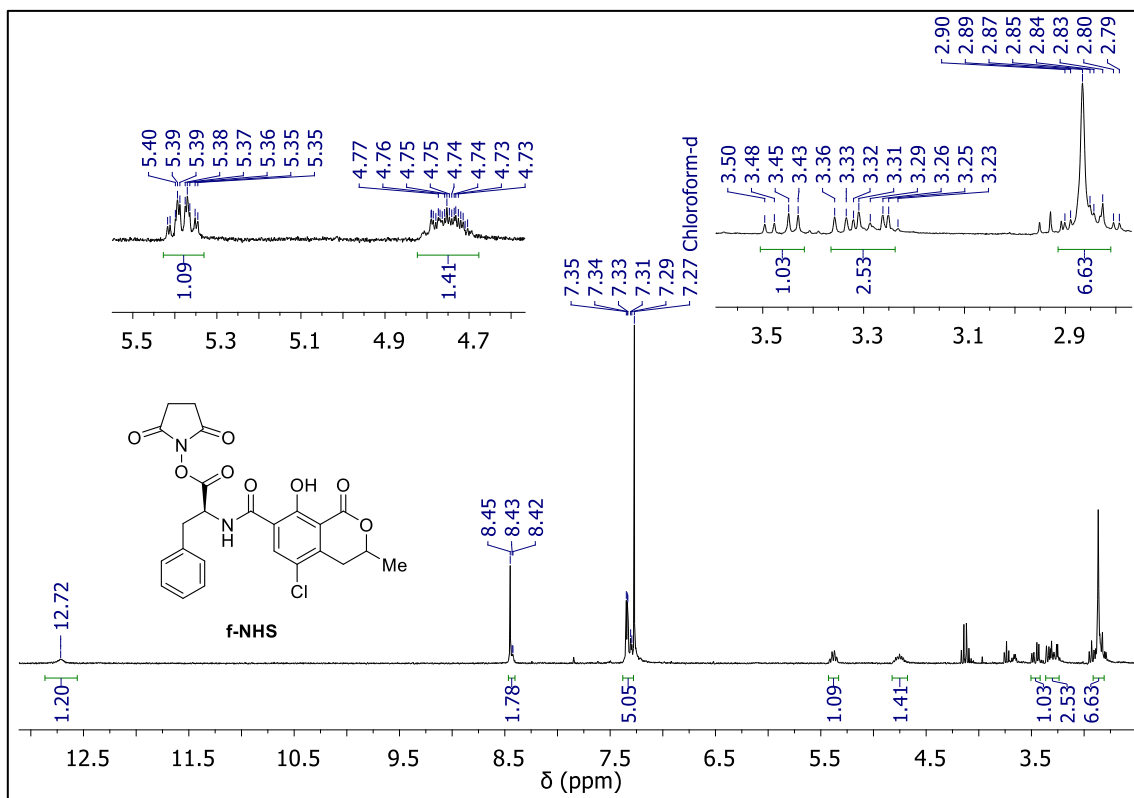
NMR spectra of intermediate **13**.

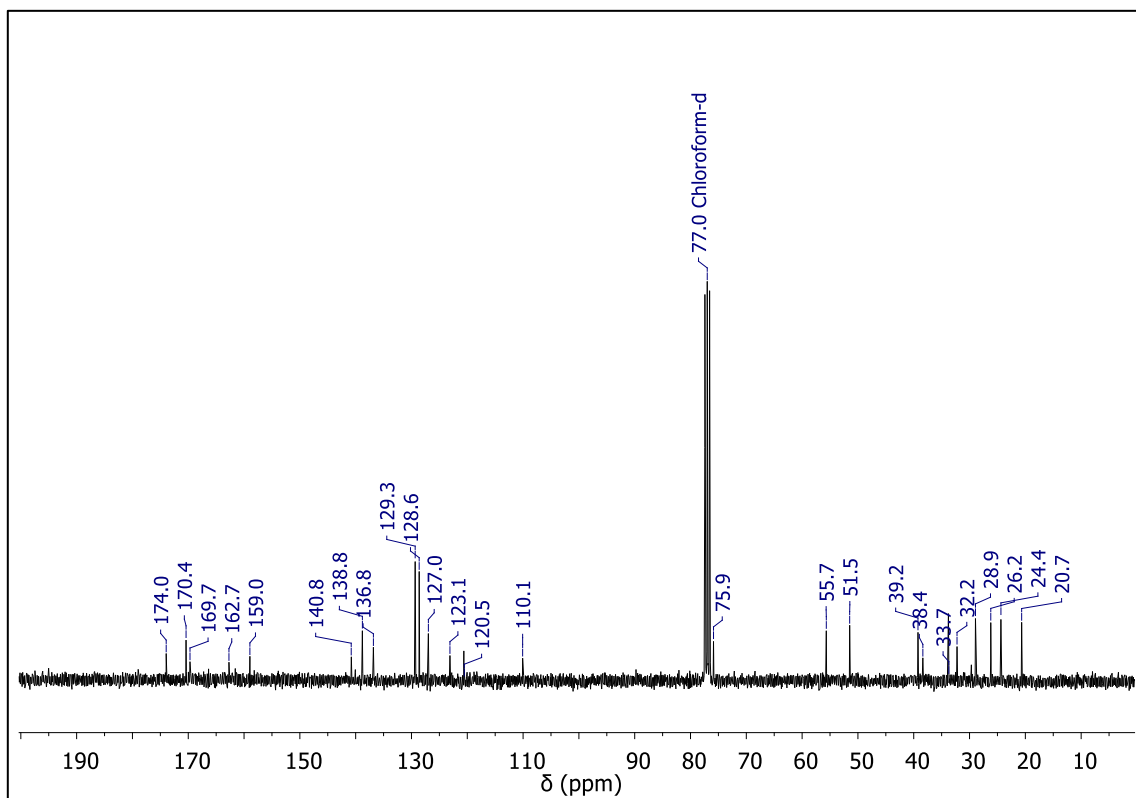
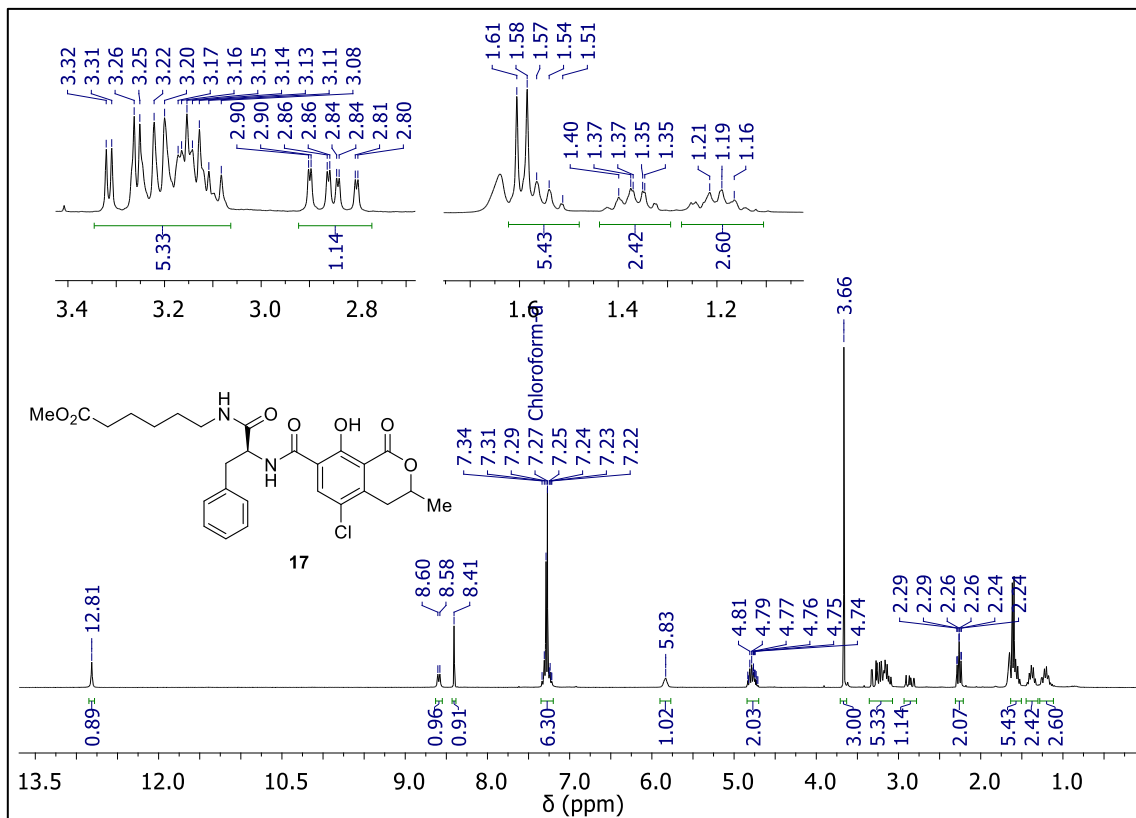
NMR spectra of **b-NHS**.

NMR spectra of intermediate **15**.

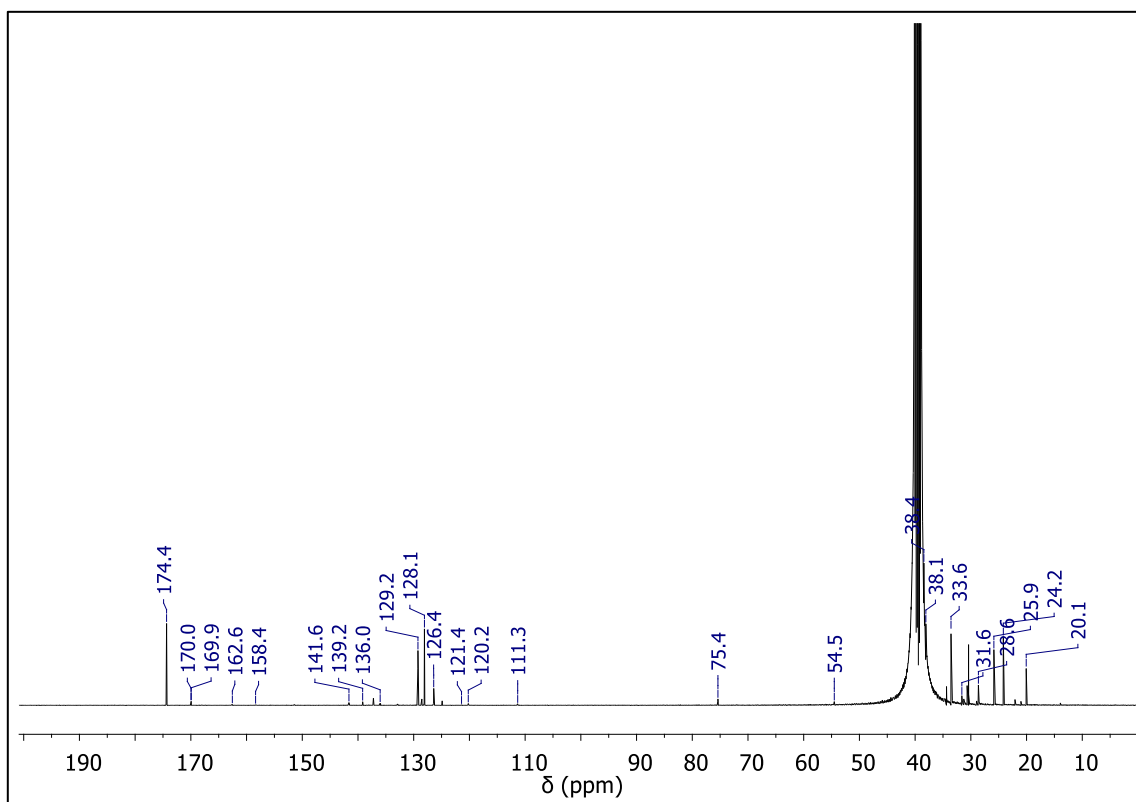
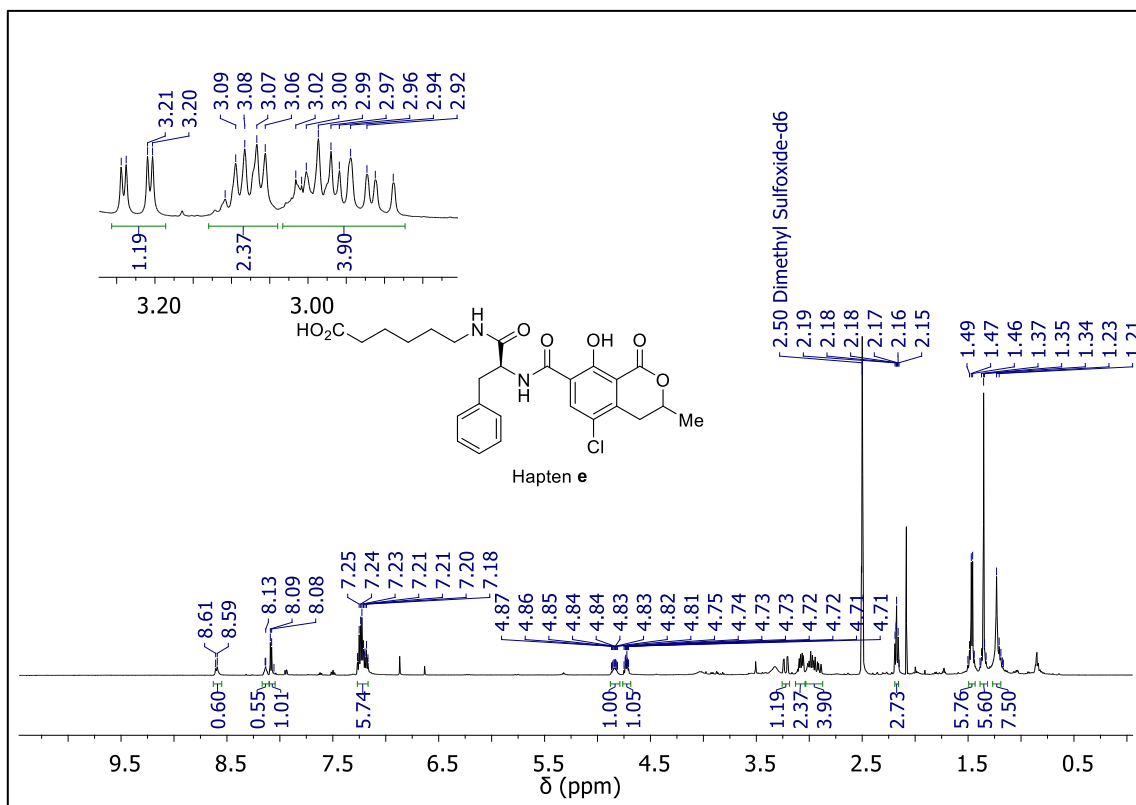
NMR spectra of Hapten f.



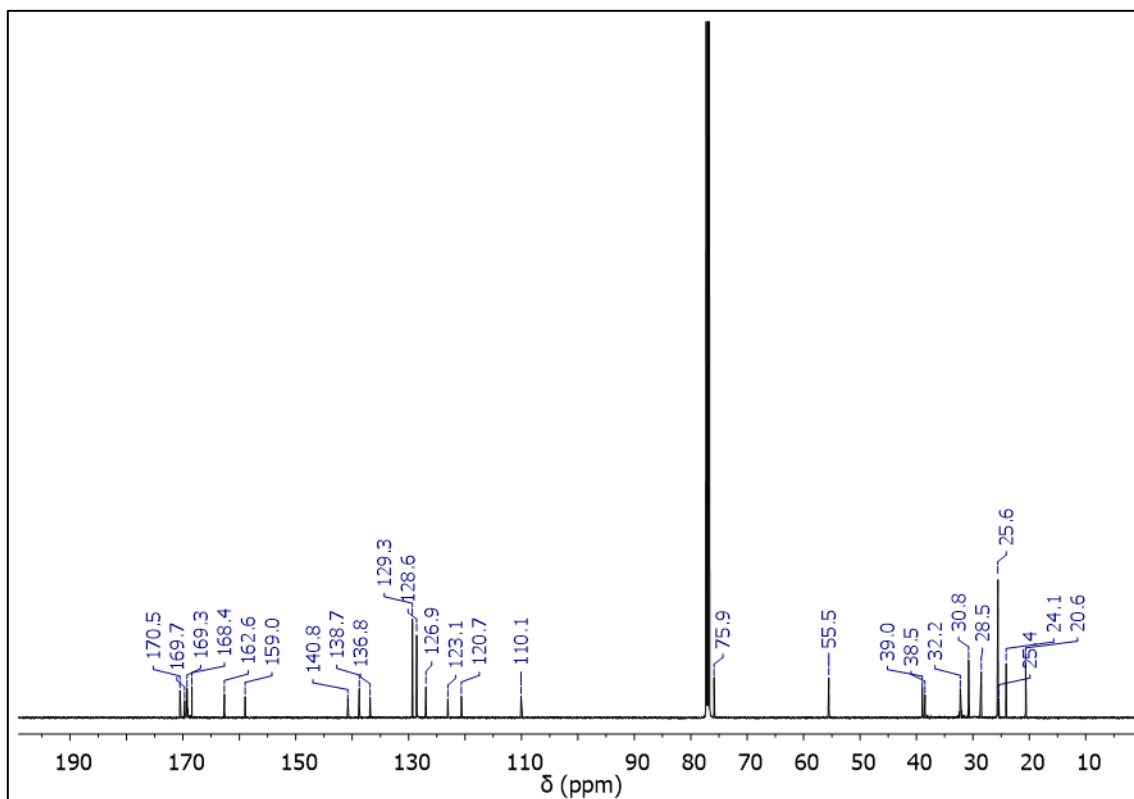
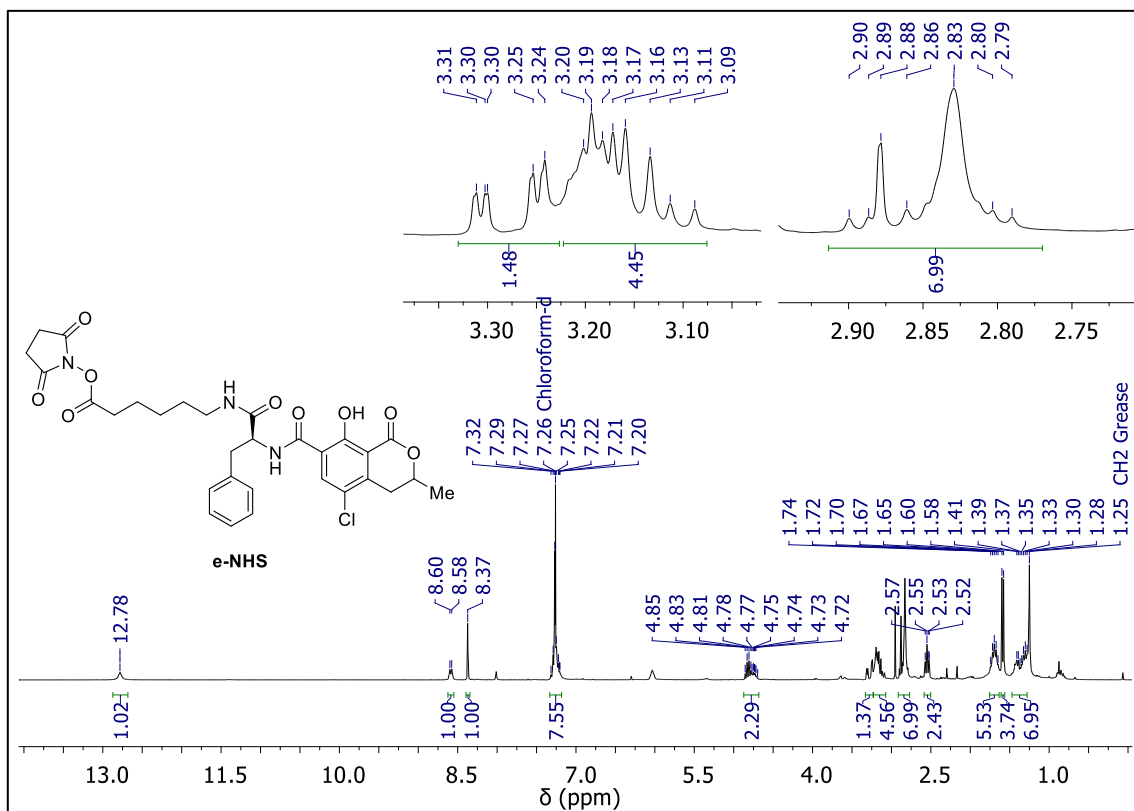
NMR spectra of **f-NHS**.

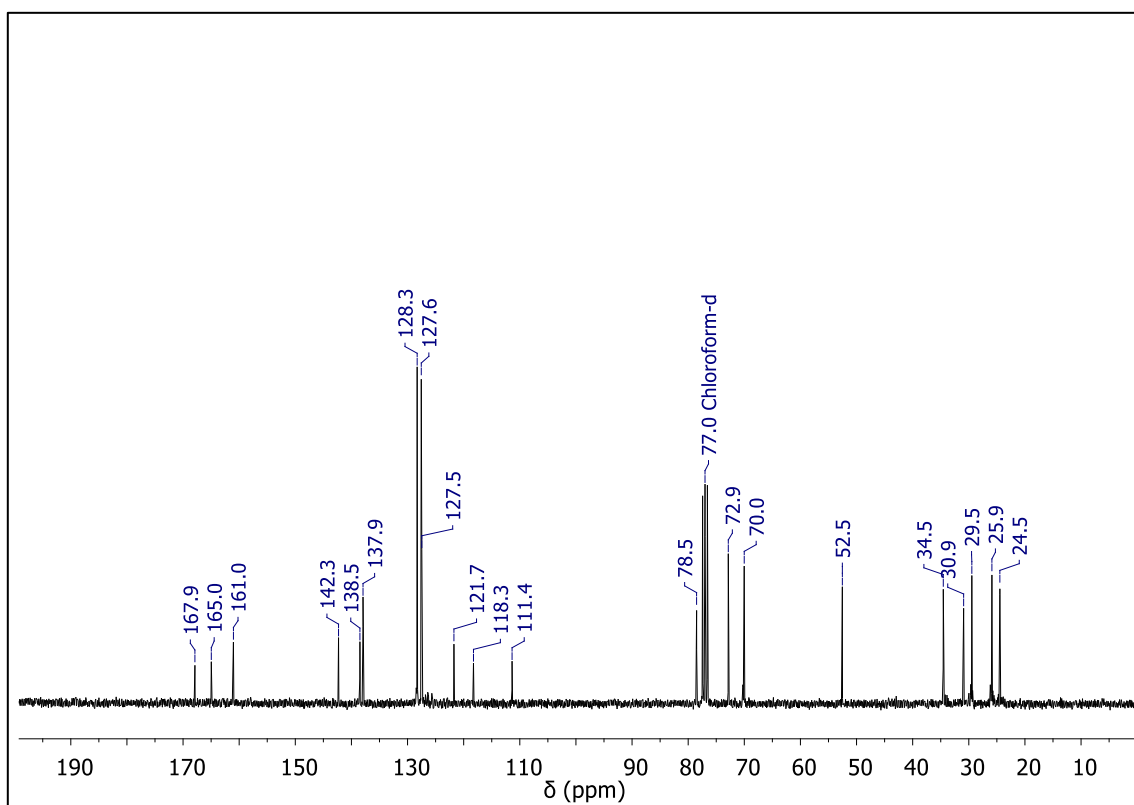
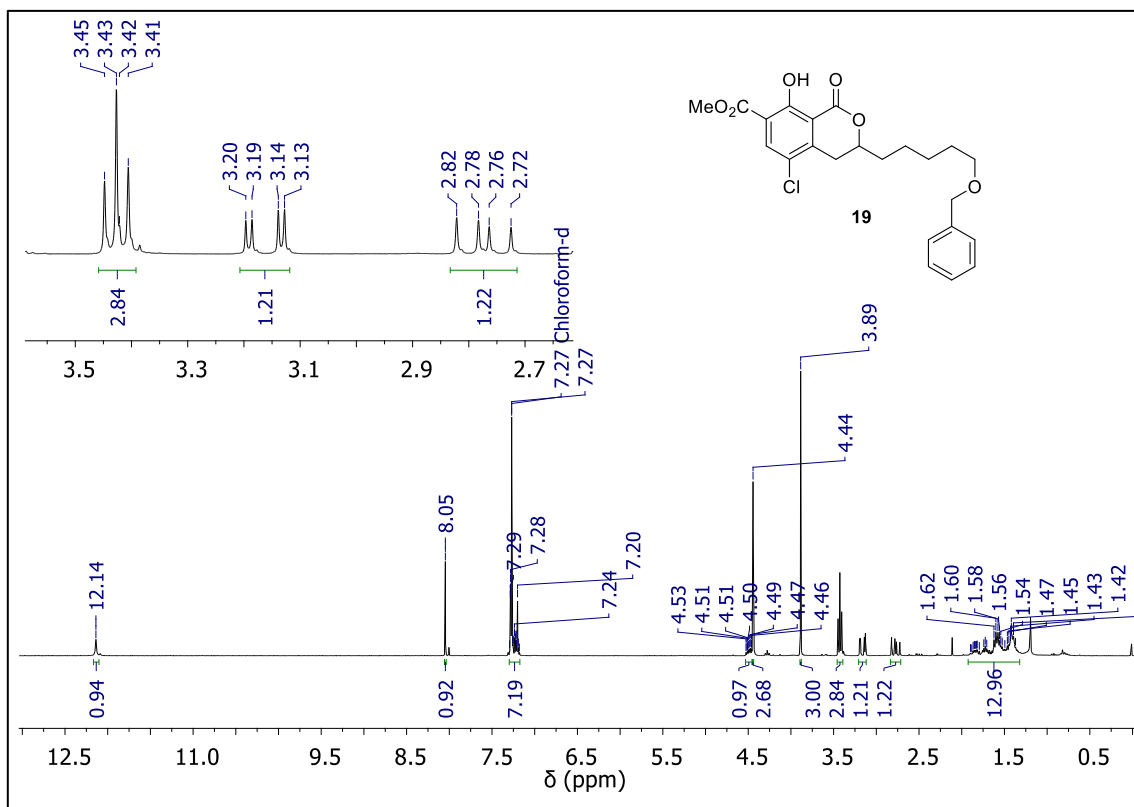
NMR spectra of intermediate **17**.

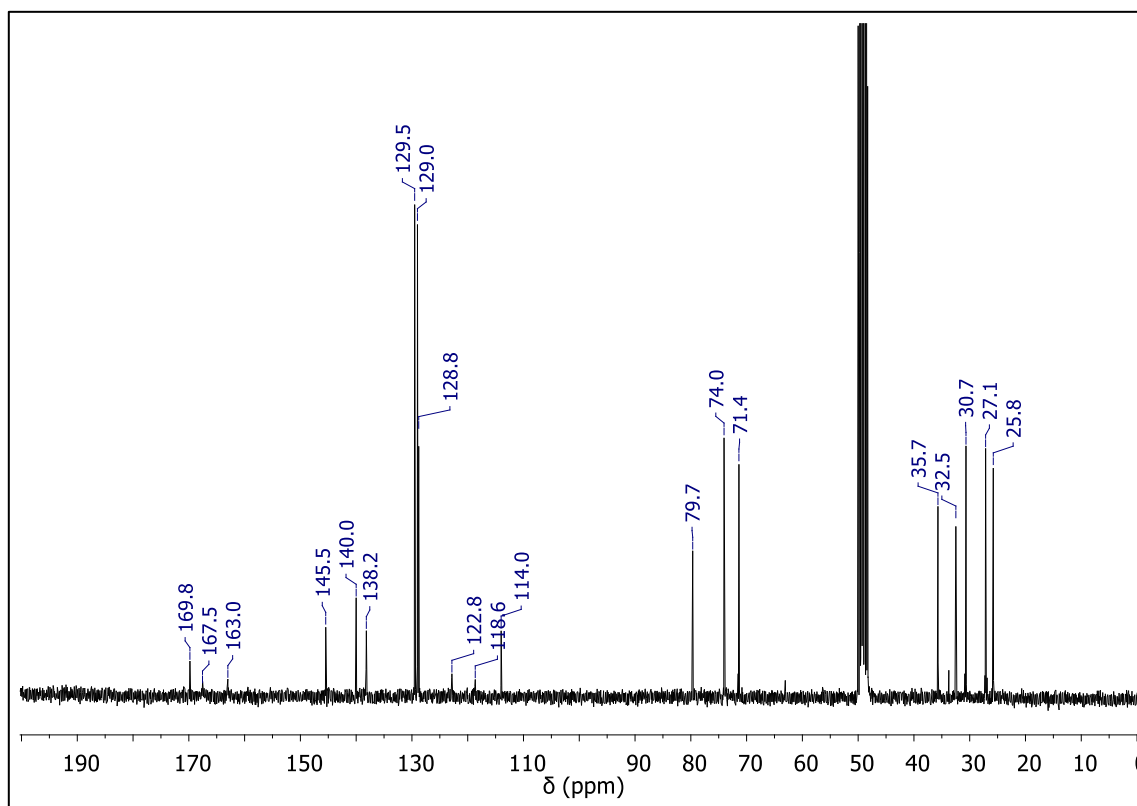
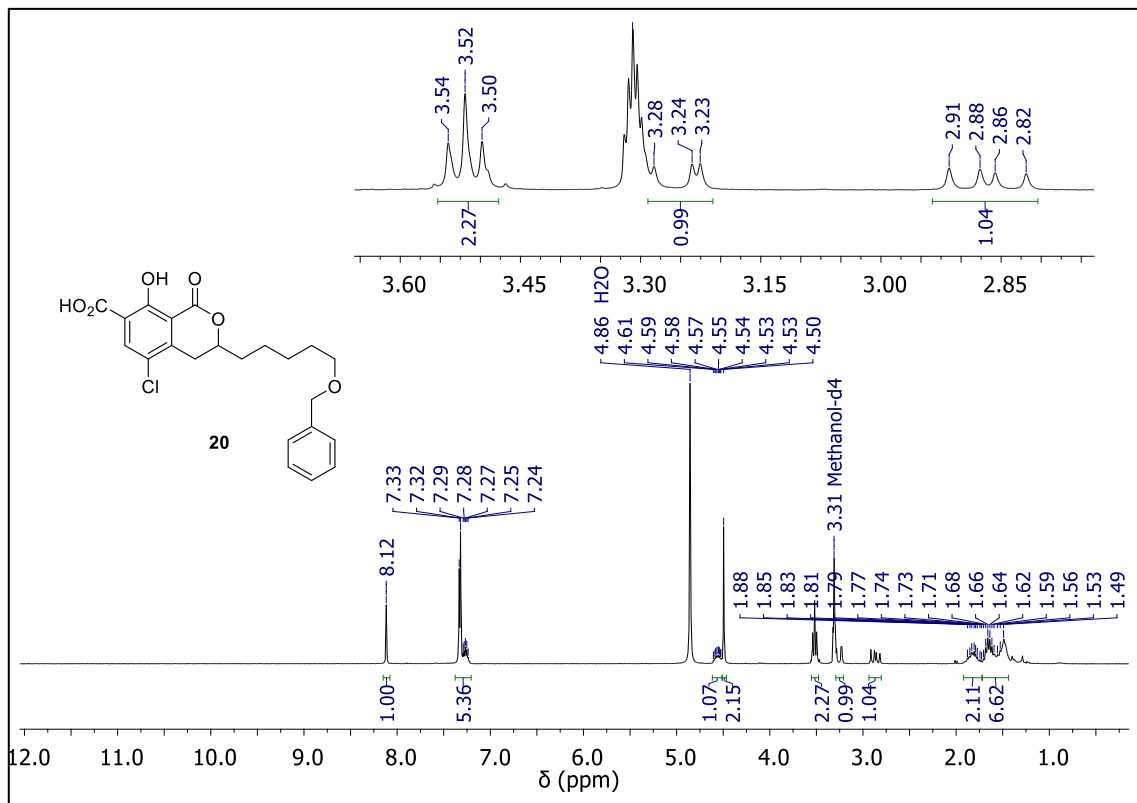
NMR spectra of Hapten e.

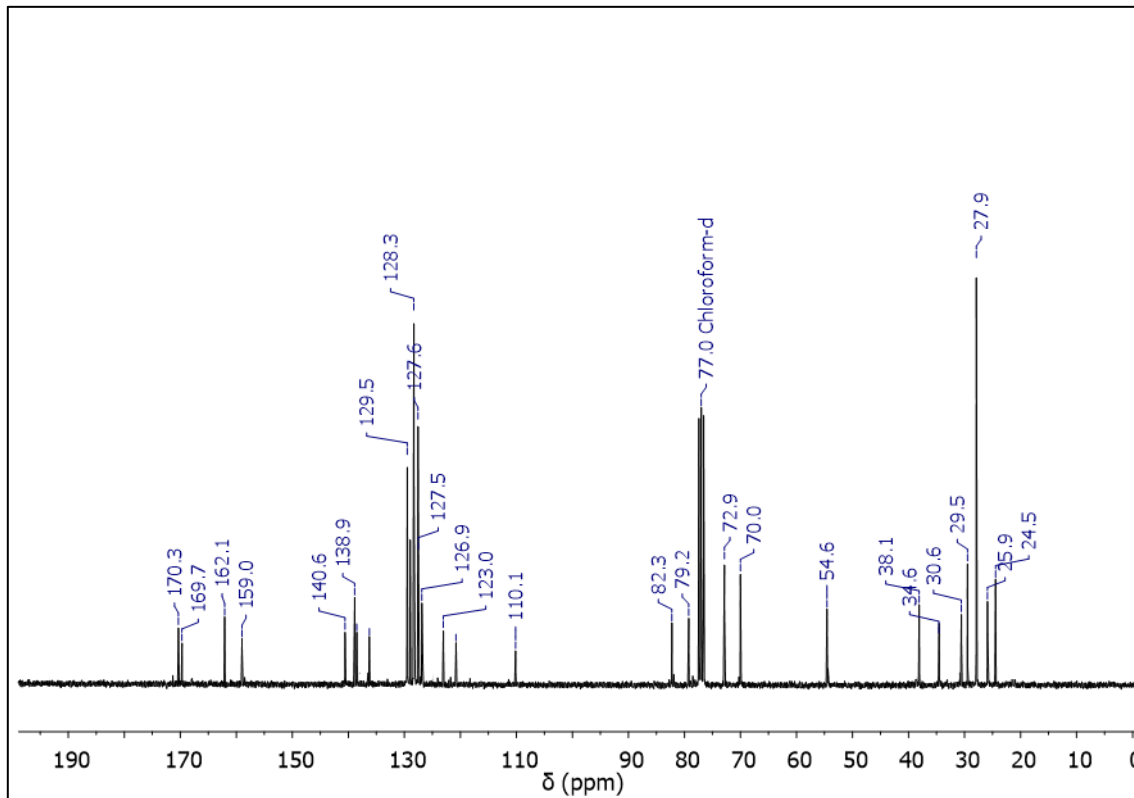
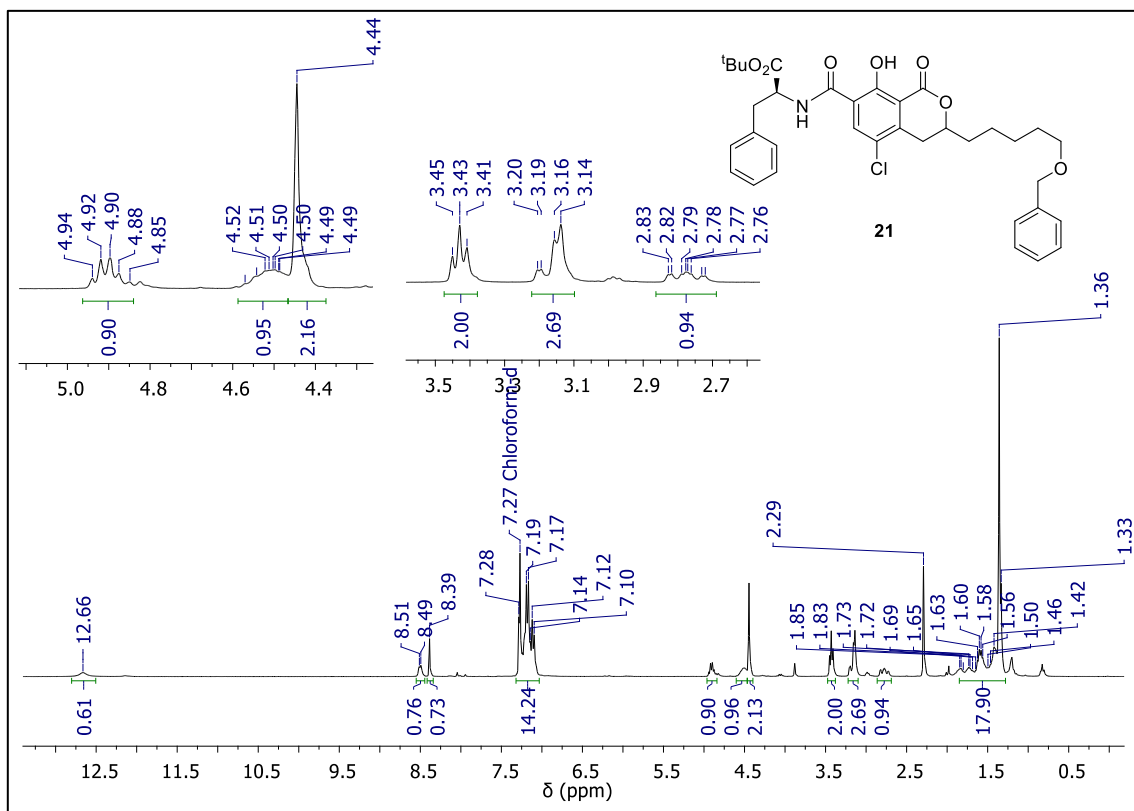


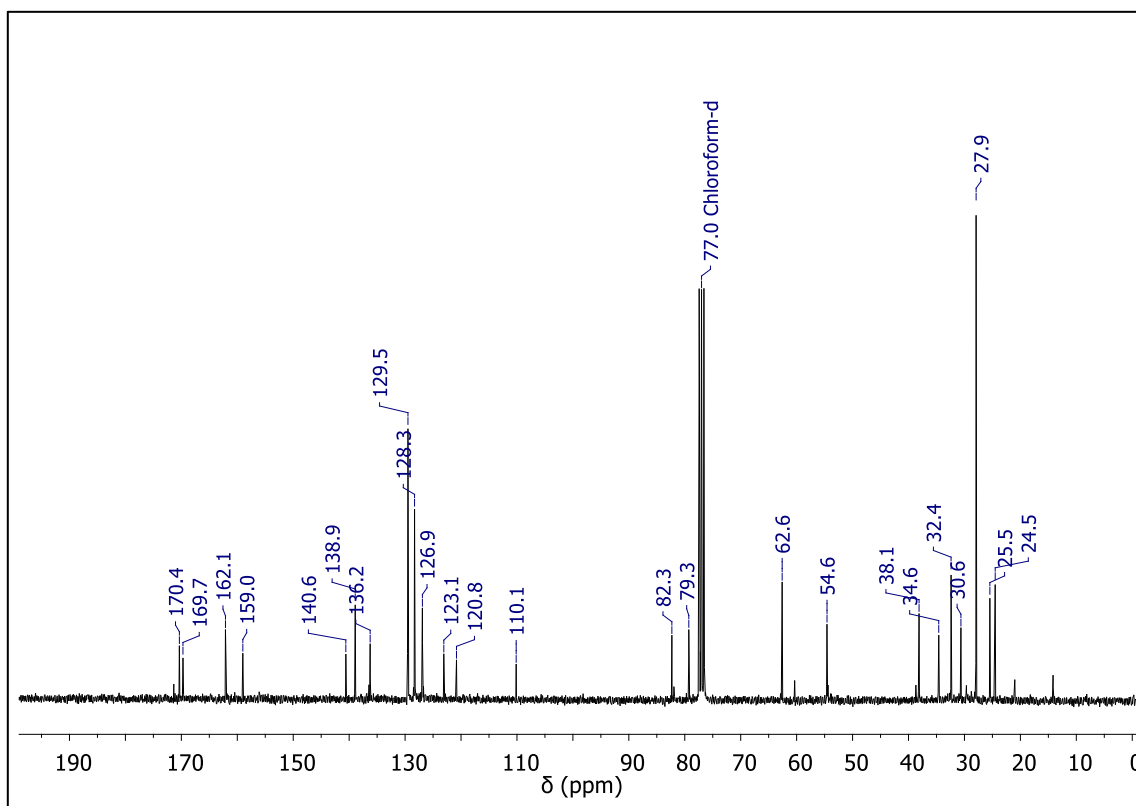
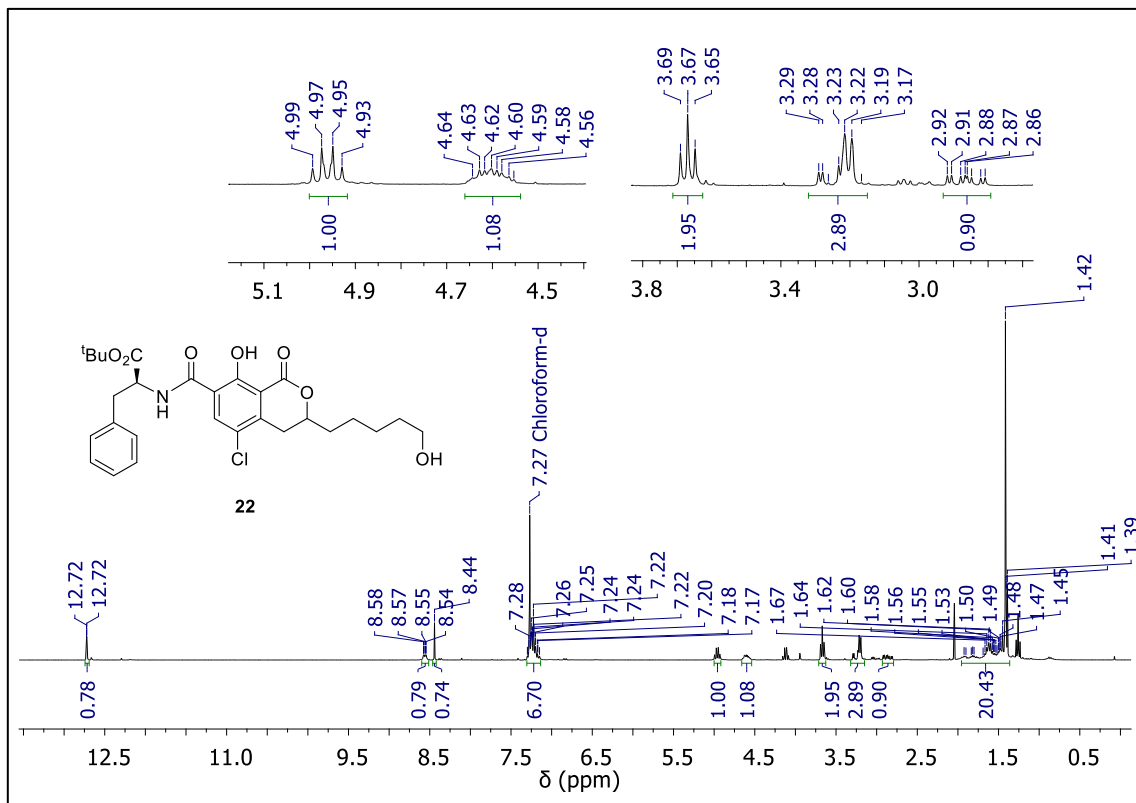
NMR spectra of e-NHS.

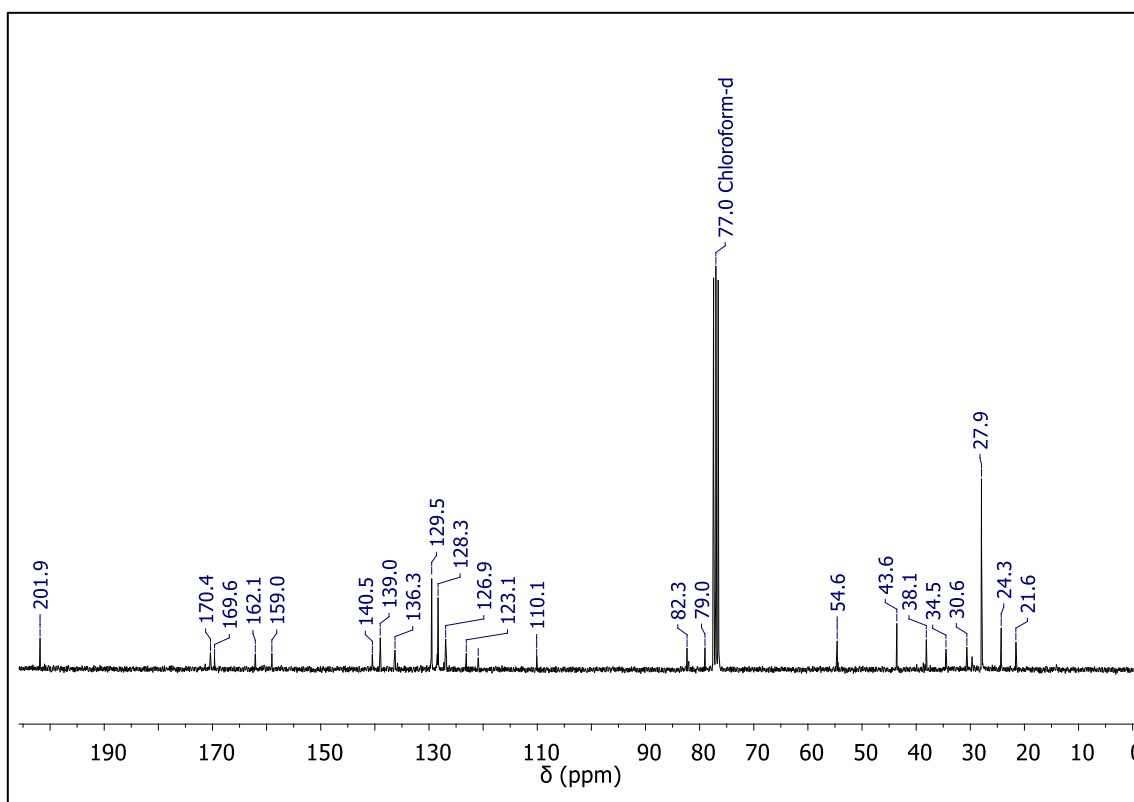
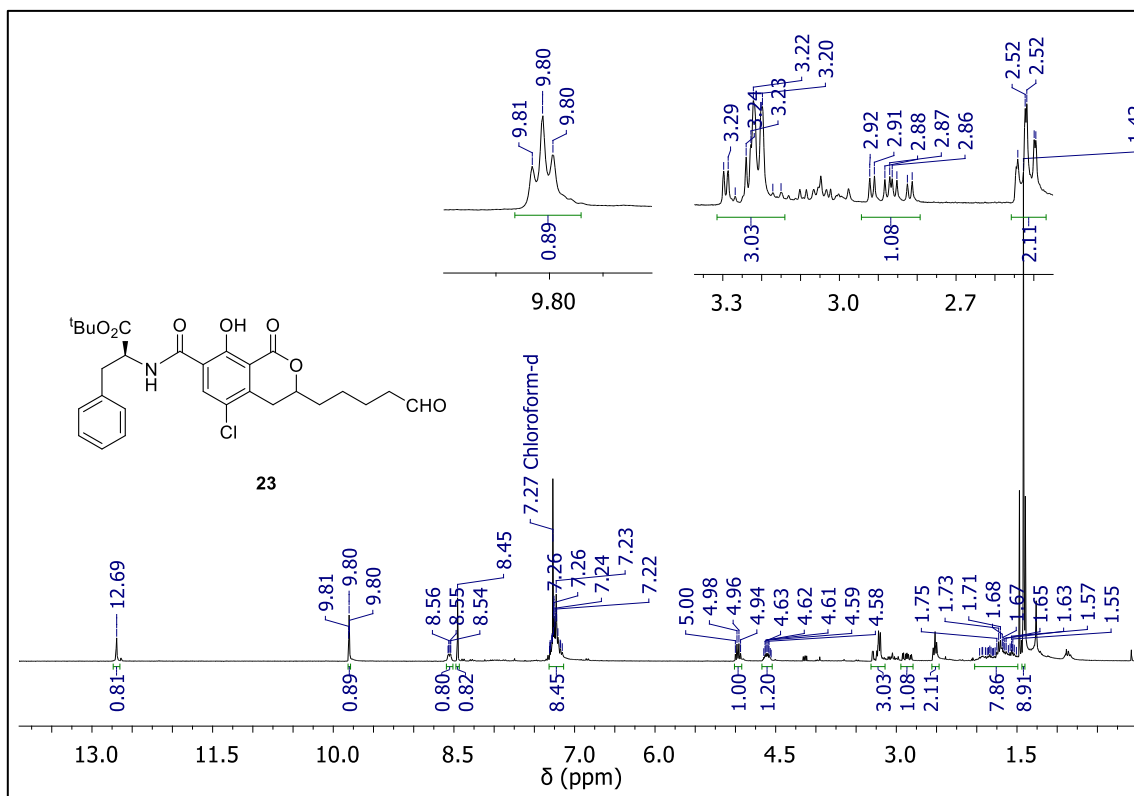


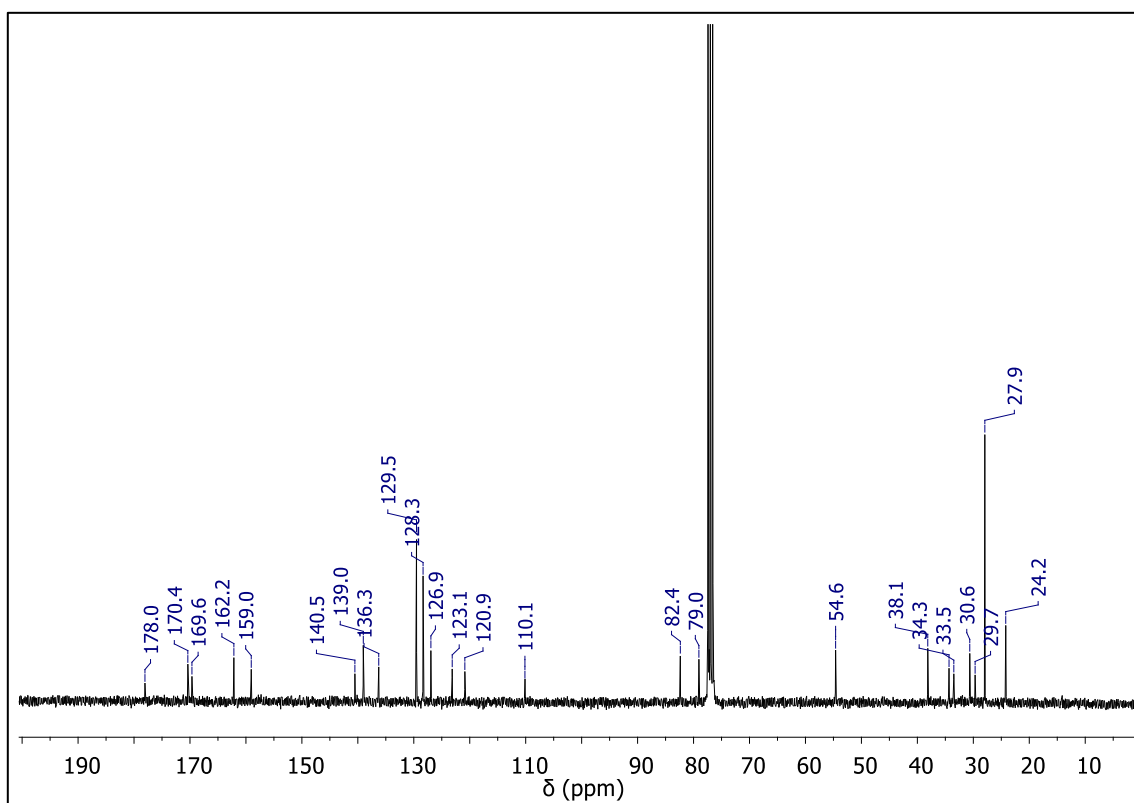
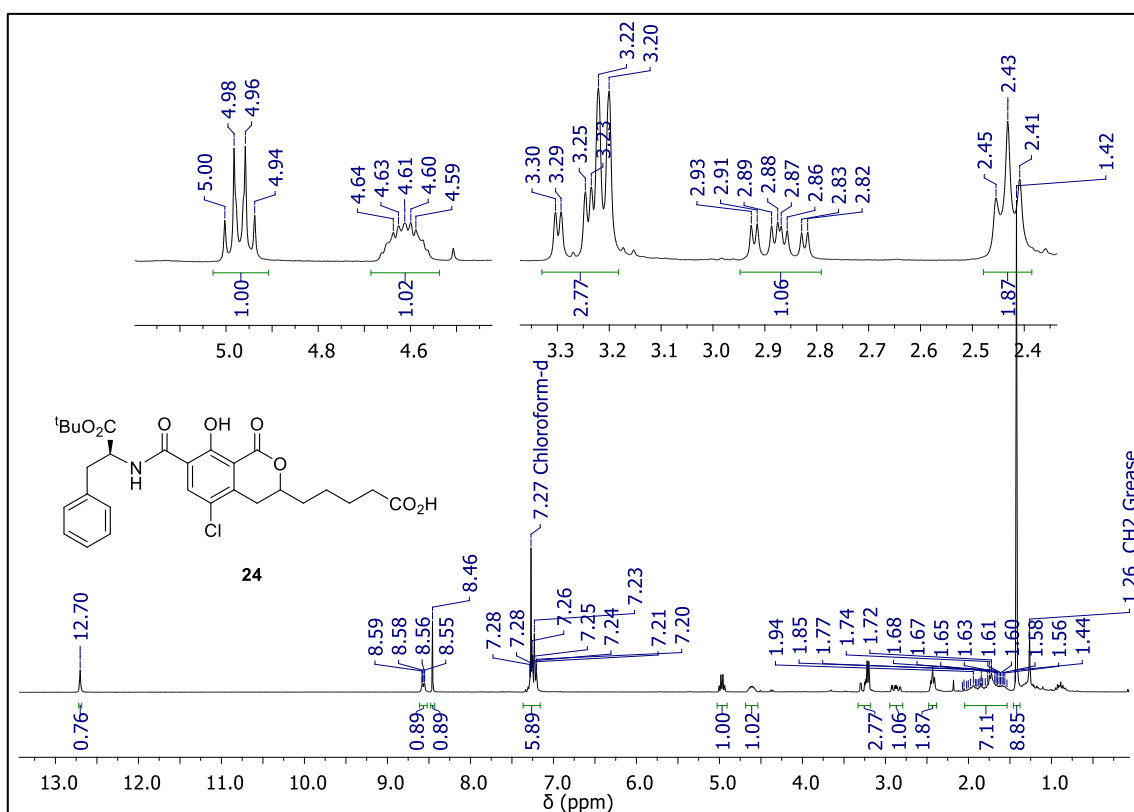
NMR spectra of intermediate **19**.

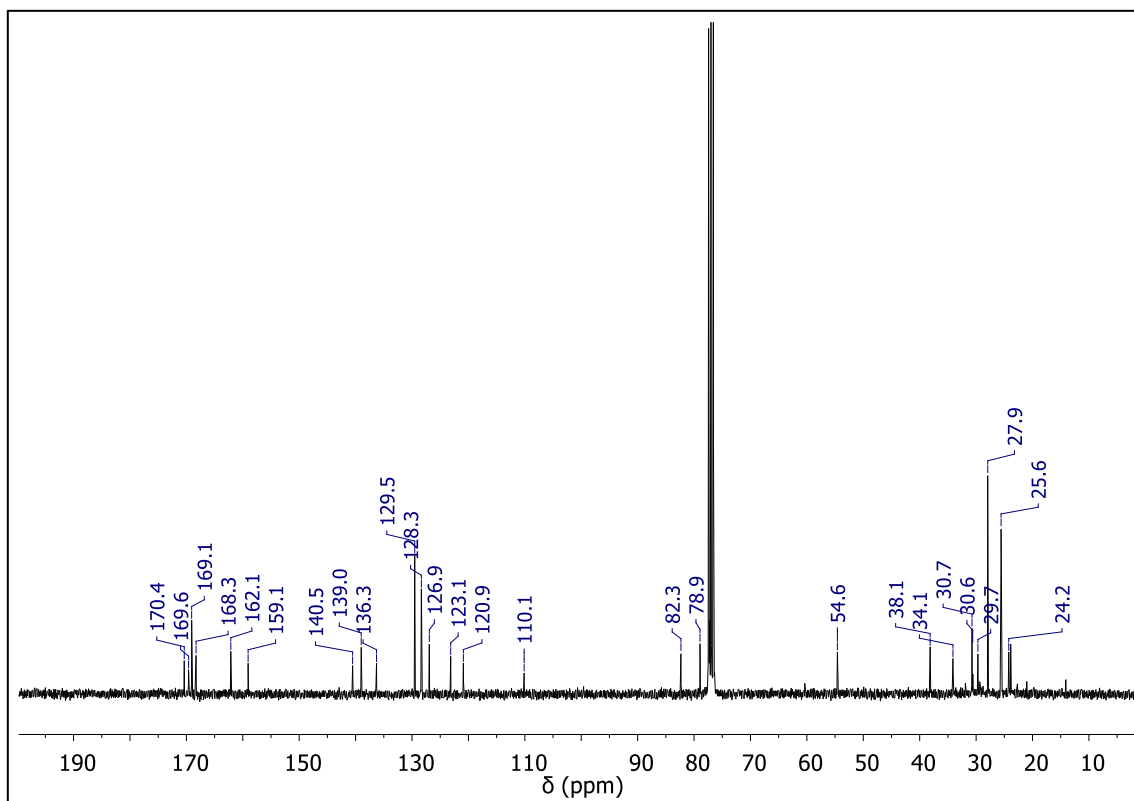
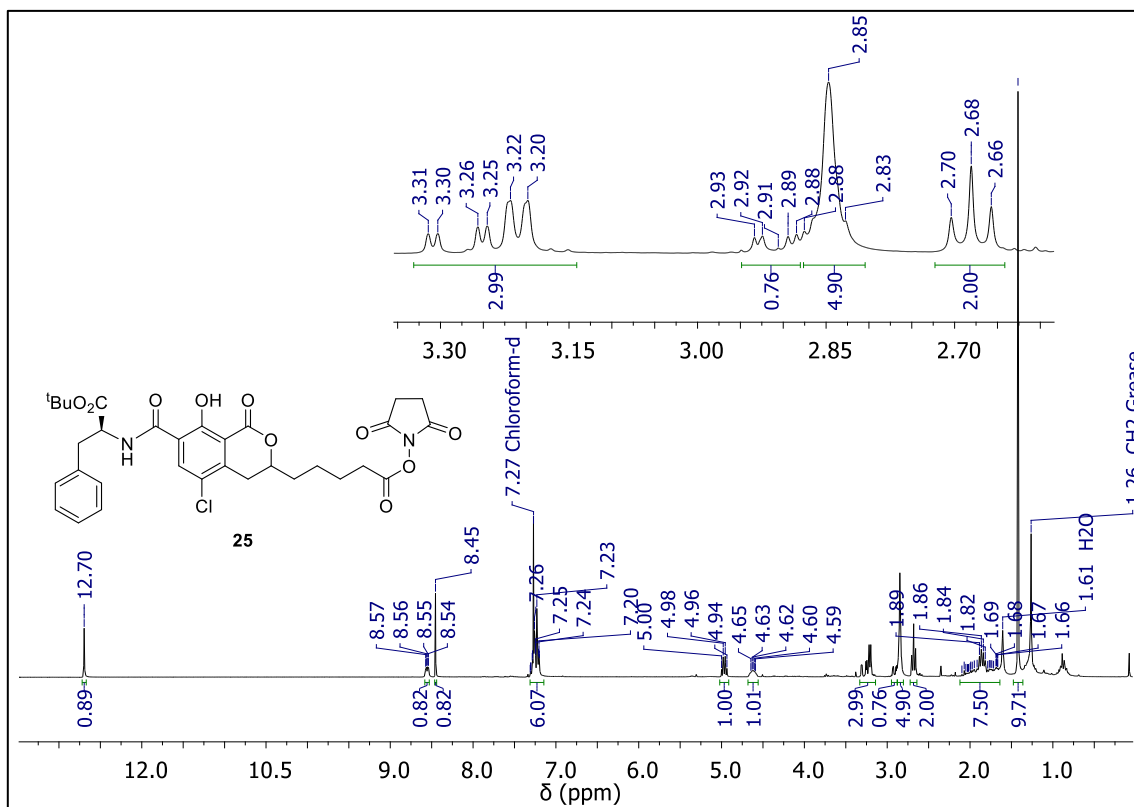
NMR spectra of intermediate **20**.

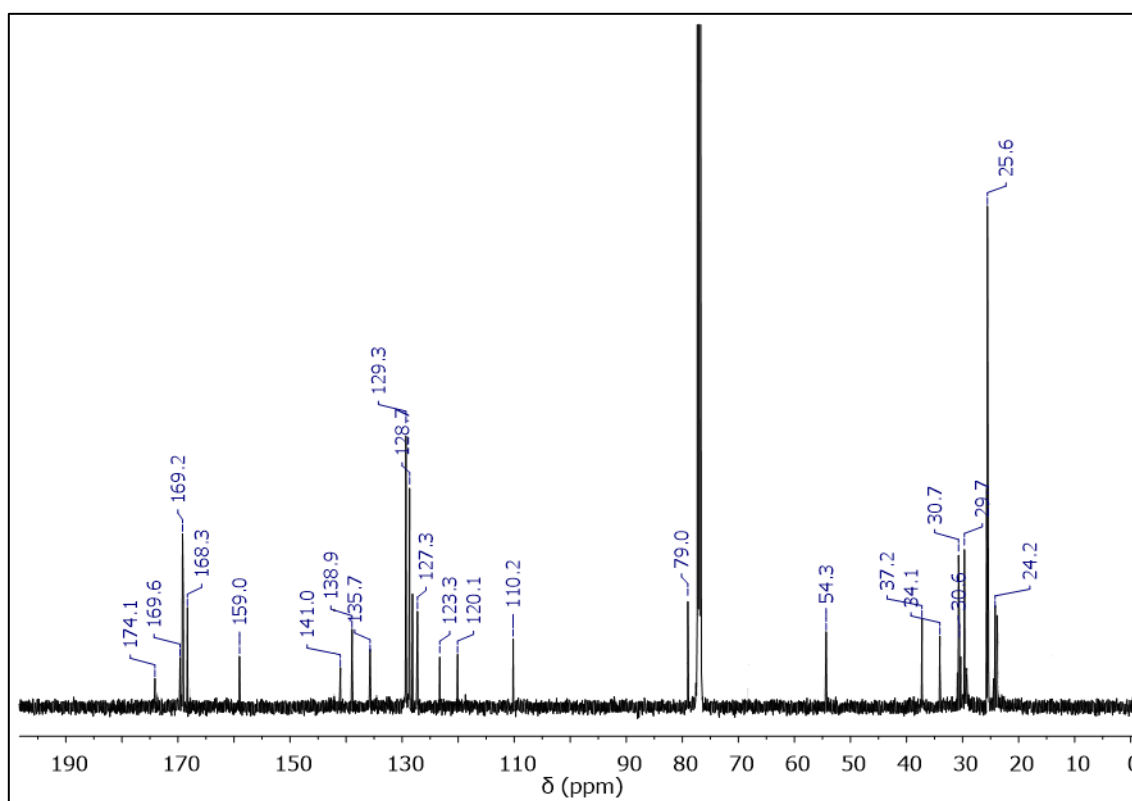
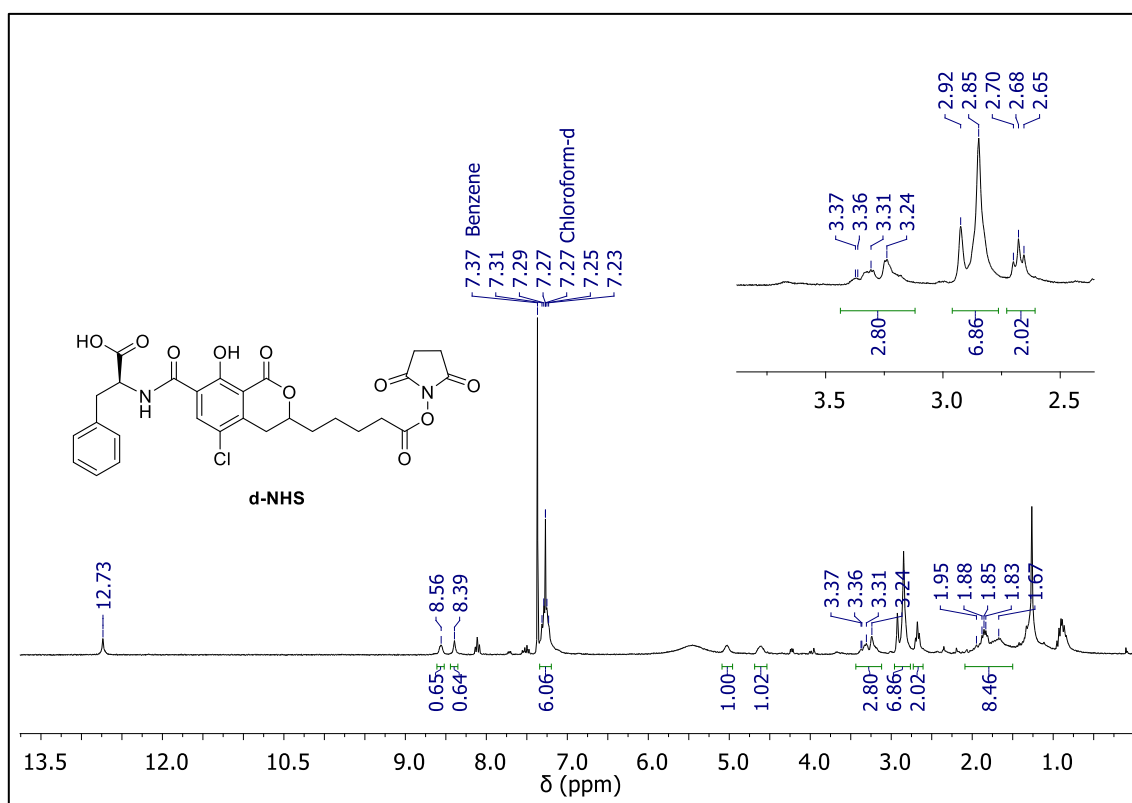
NMR spectra of intermediate **21**.

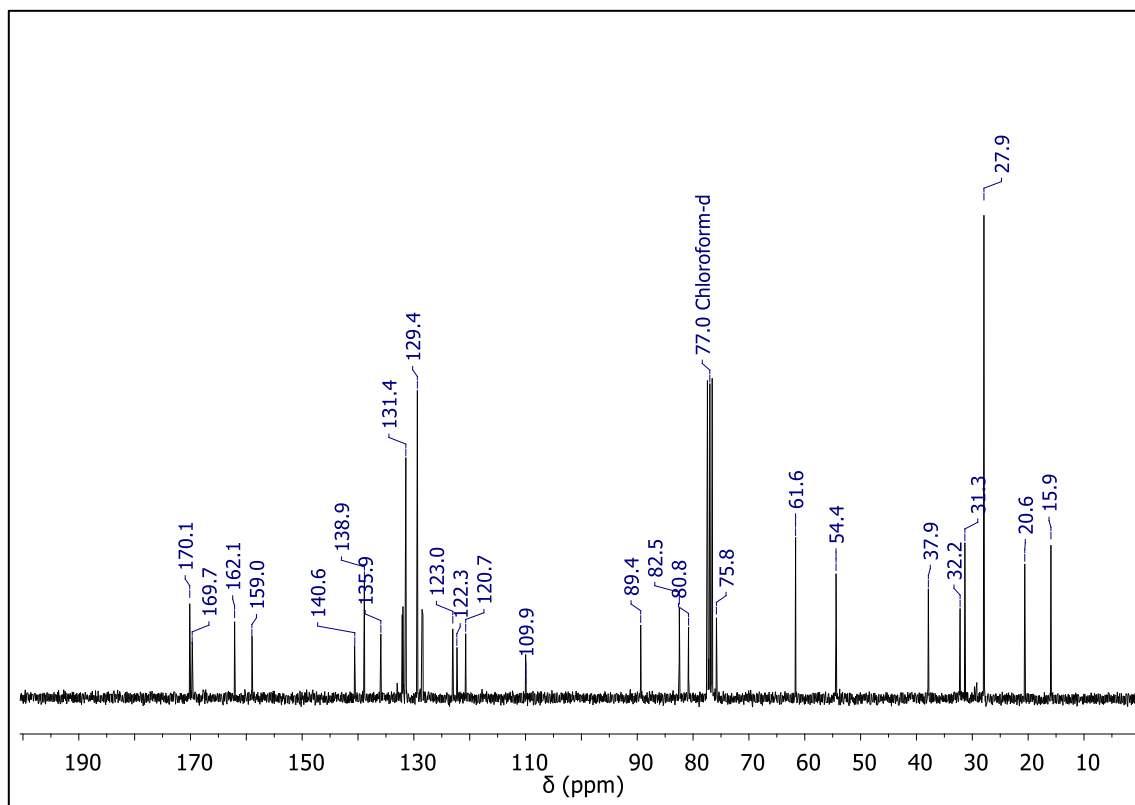
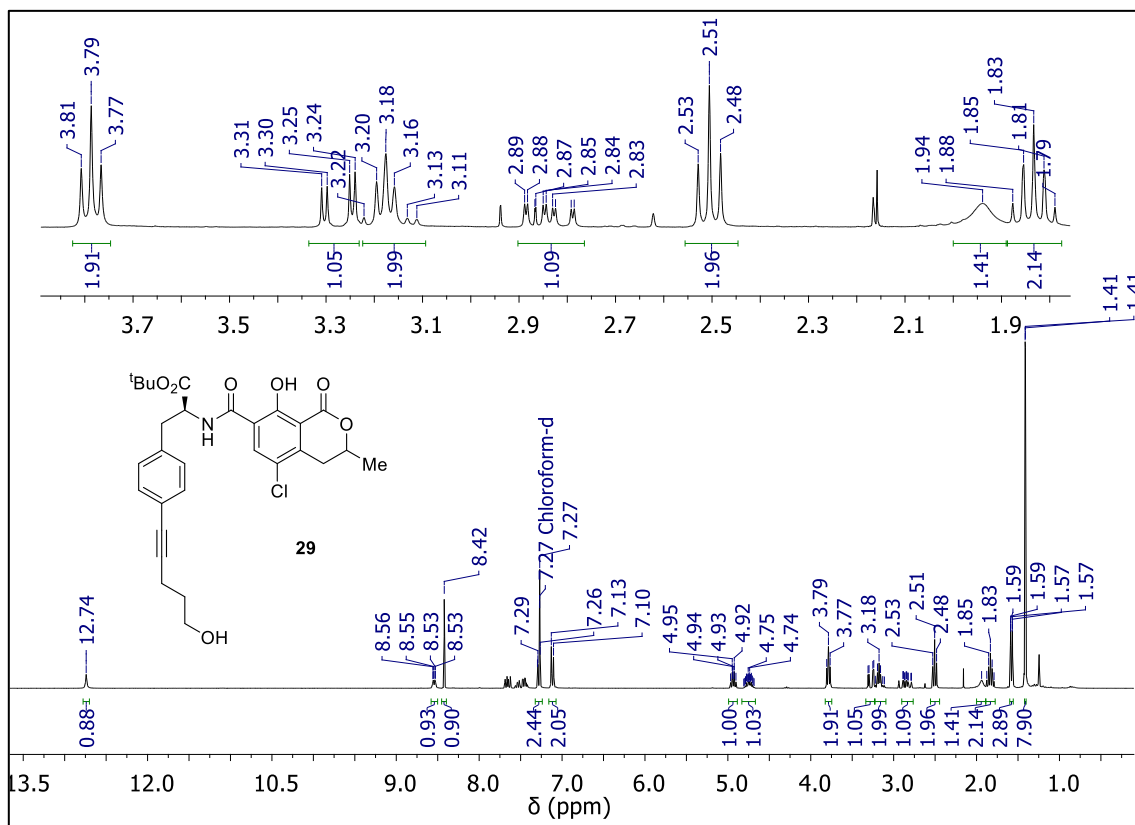
NMR spectra of intermediate **22**.

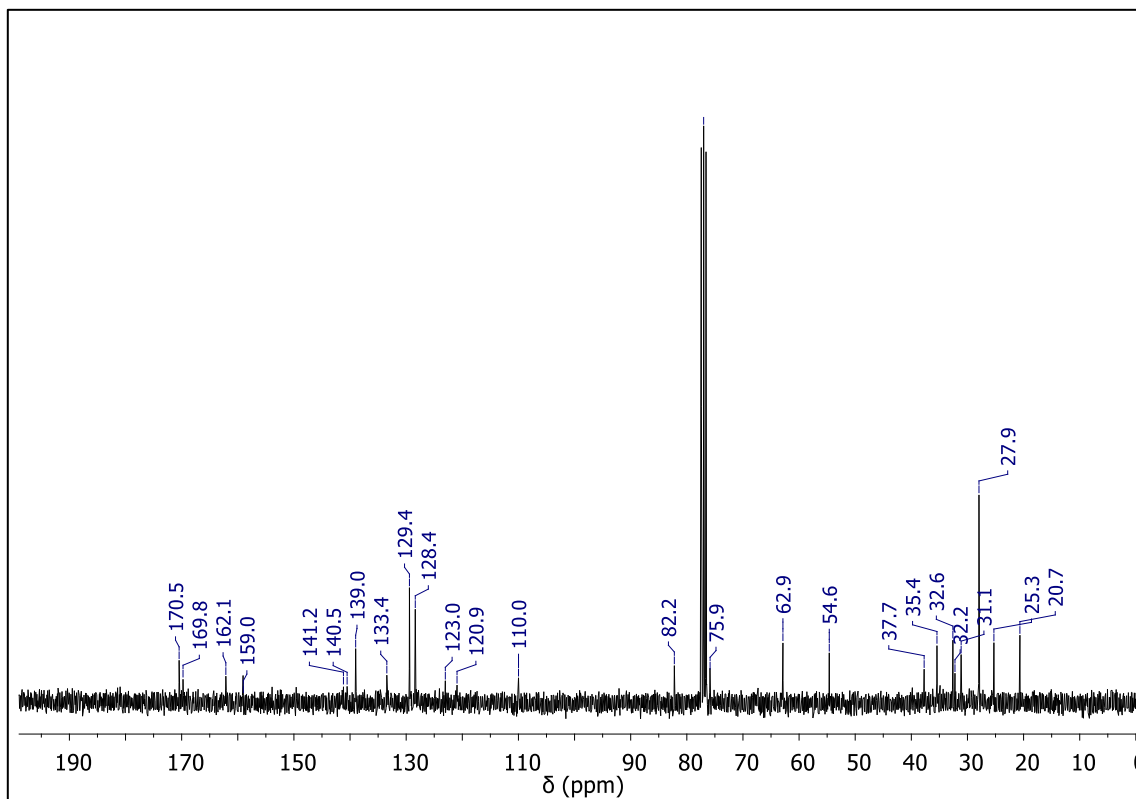
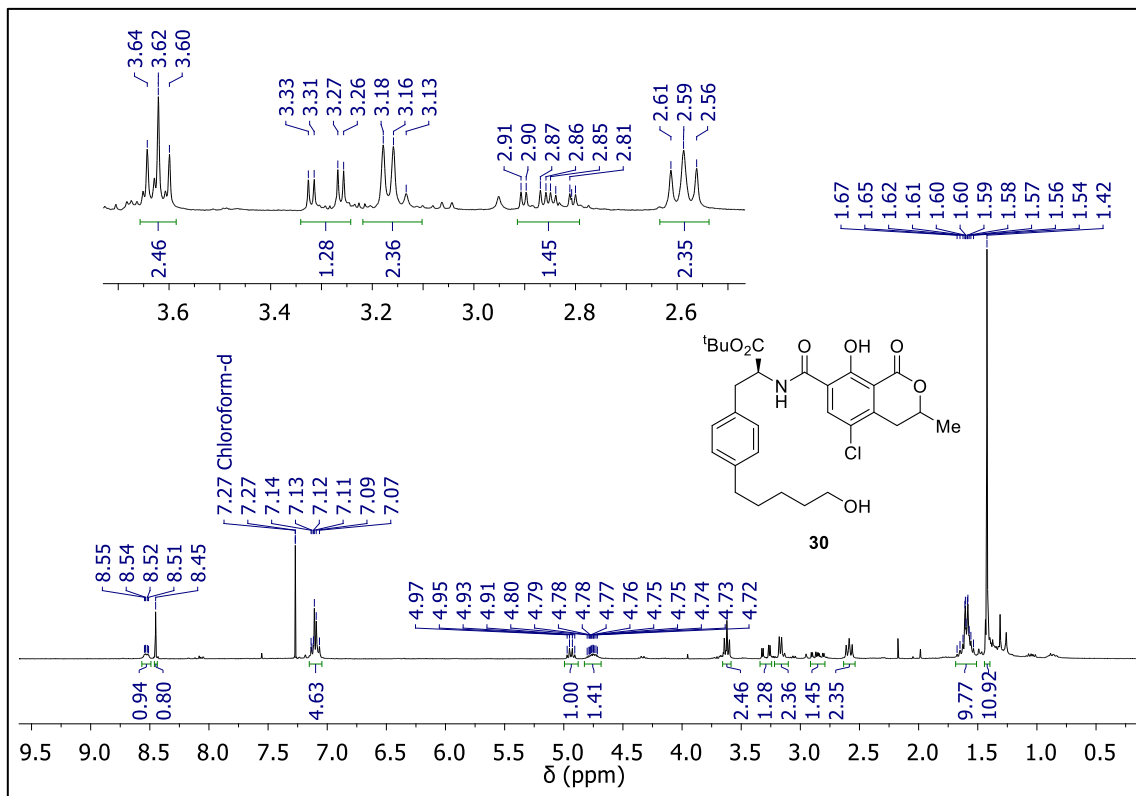
NMR spectra of intermediate **23**.

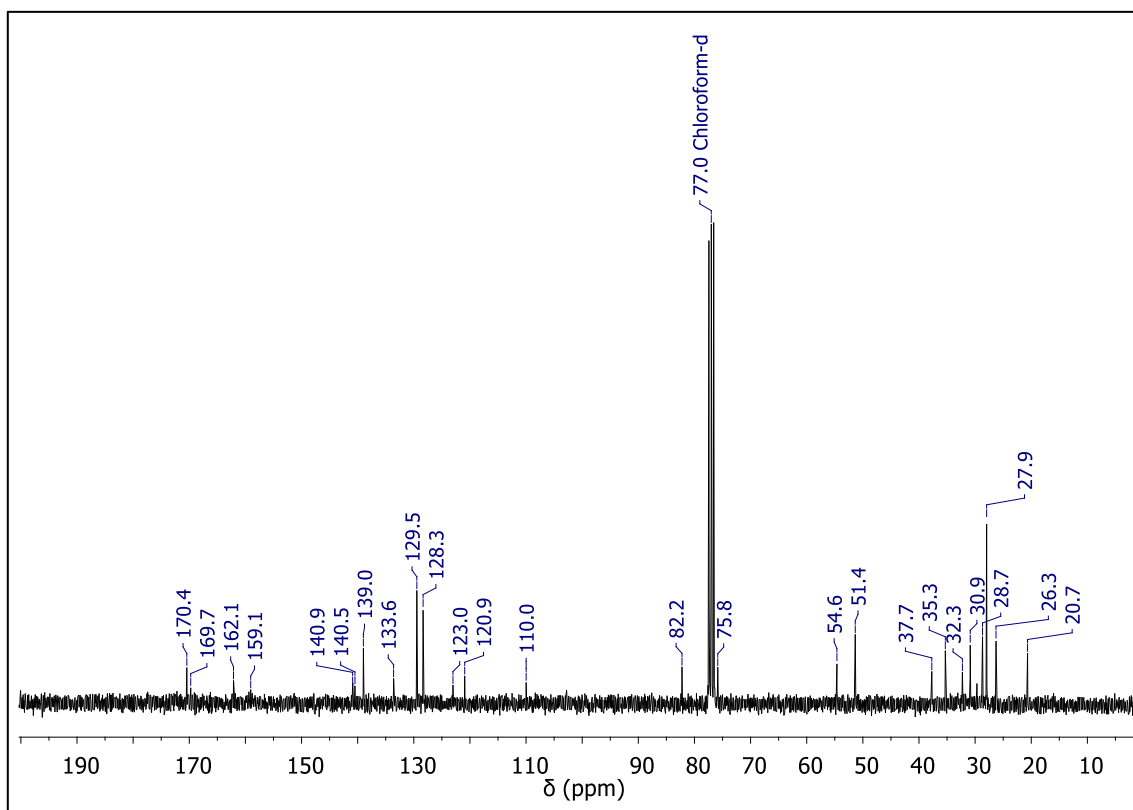
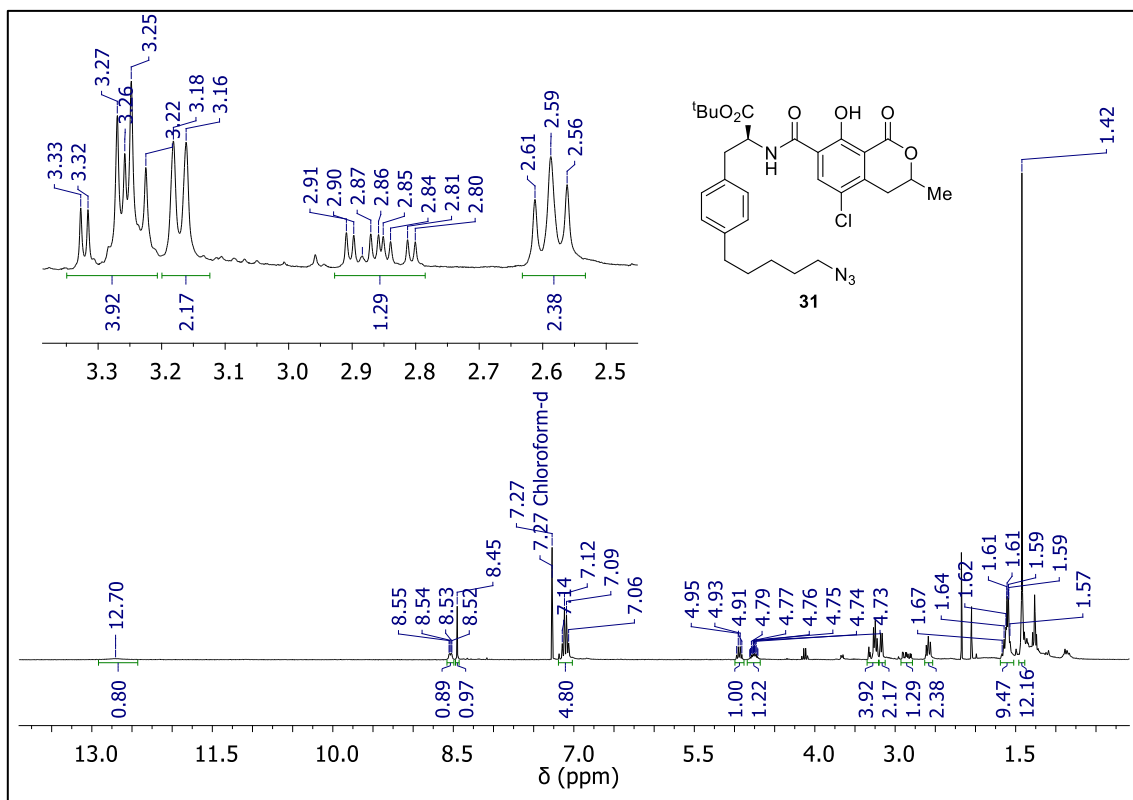
NMR spectra of intermediate **24**.

NMR spectra of intermediate **25**.

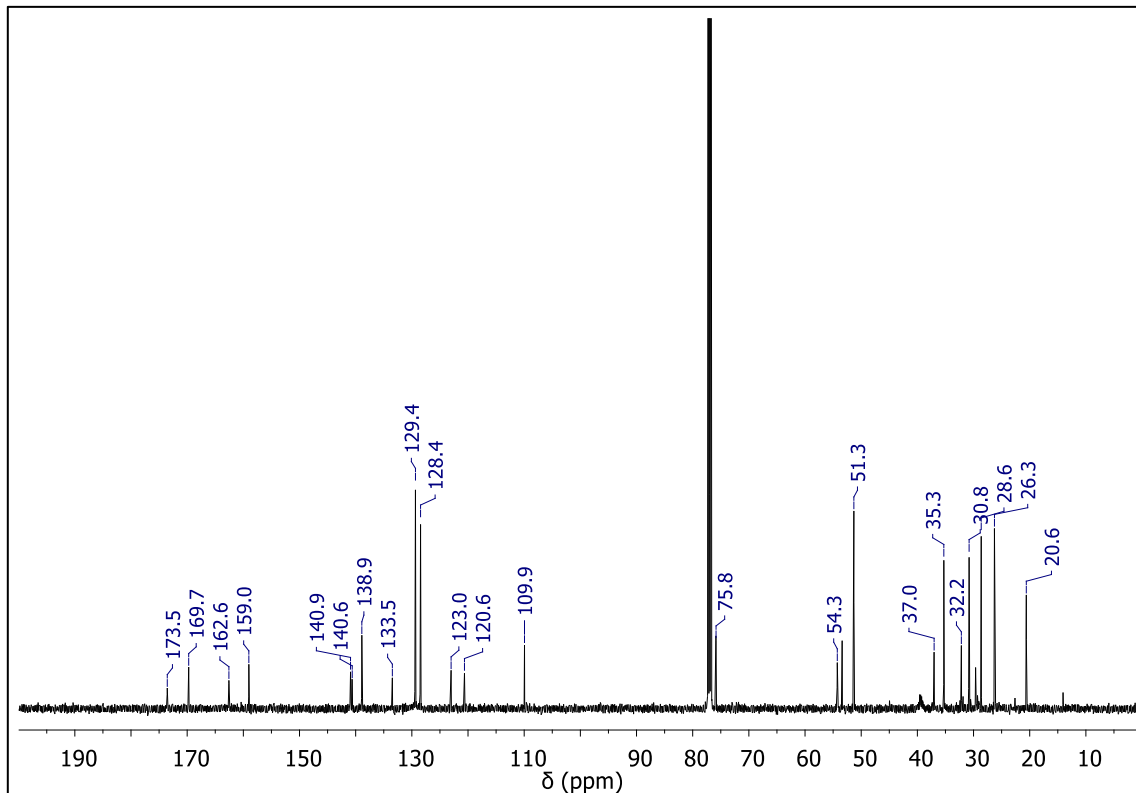
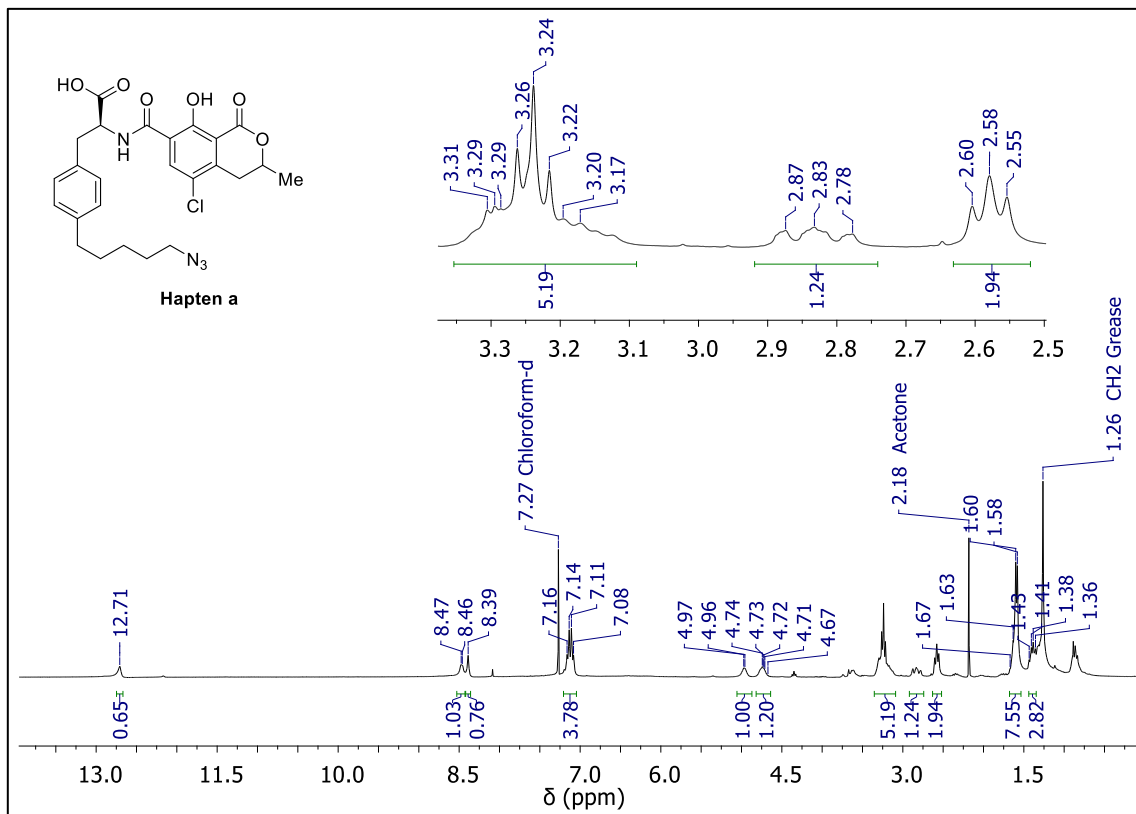
NMR spectra of **d-NHS**.

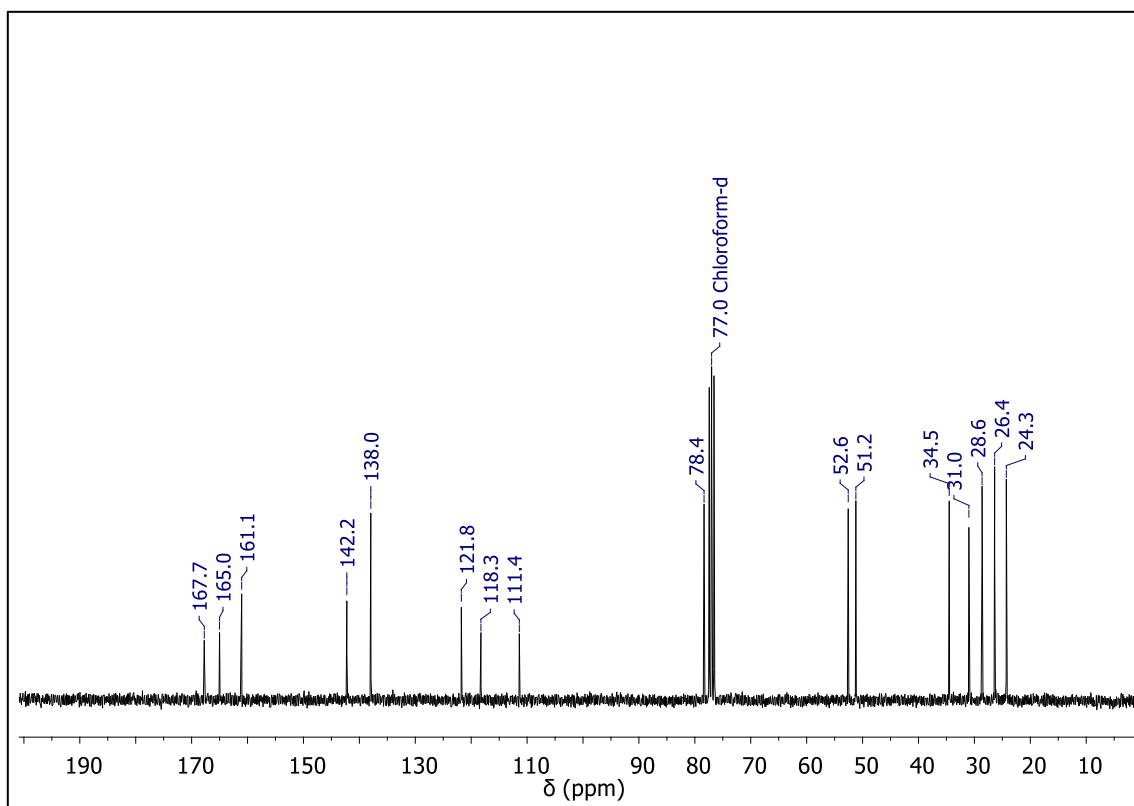
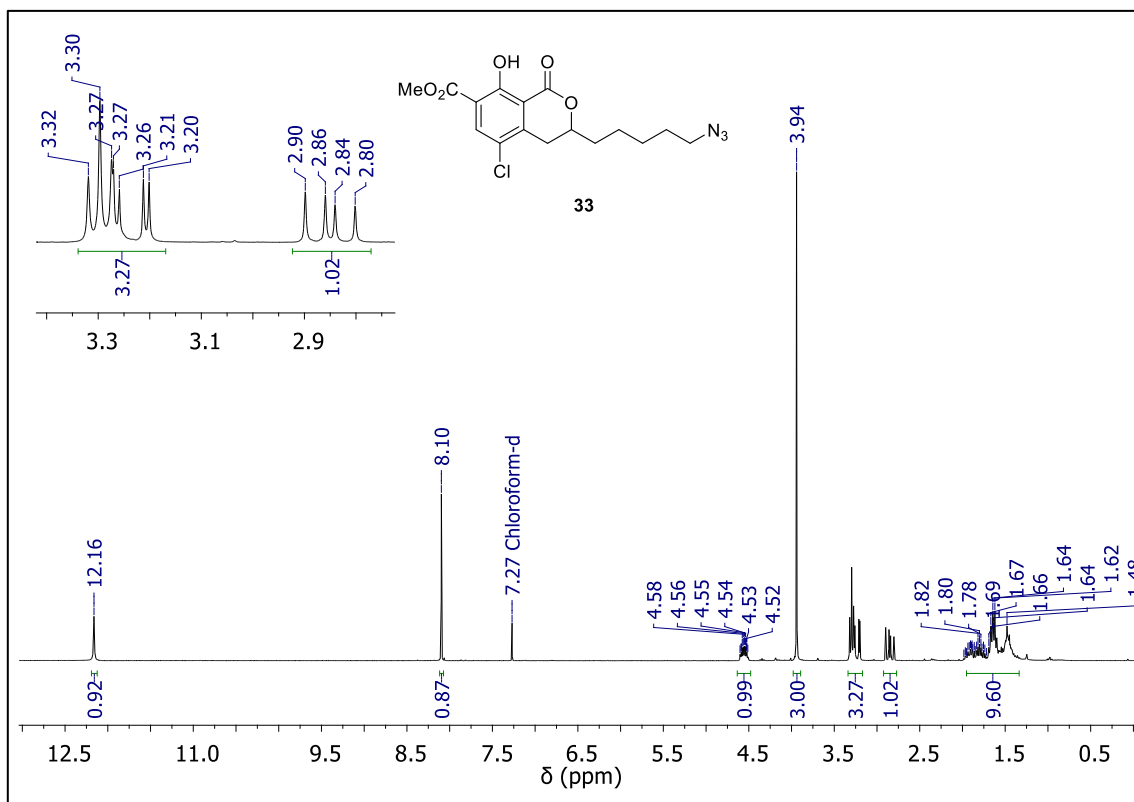
NMR spectra of intermediate **29**.

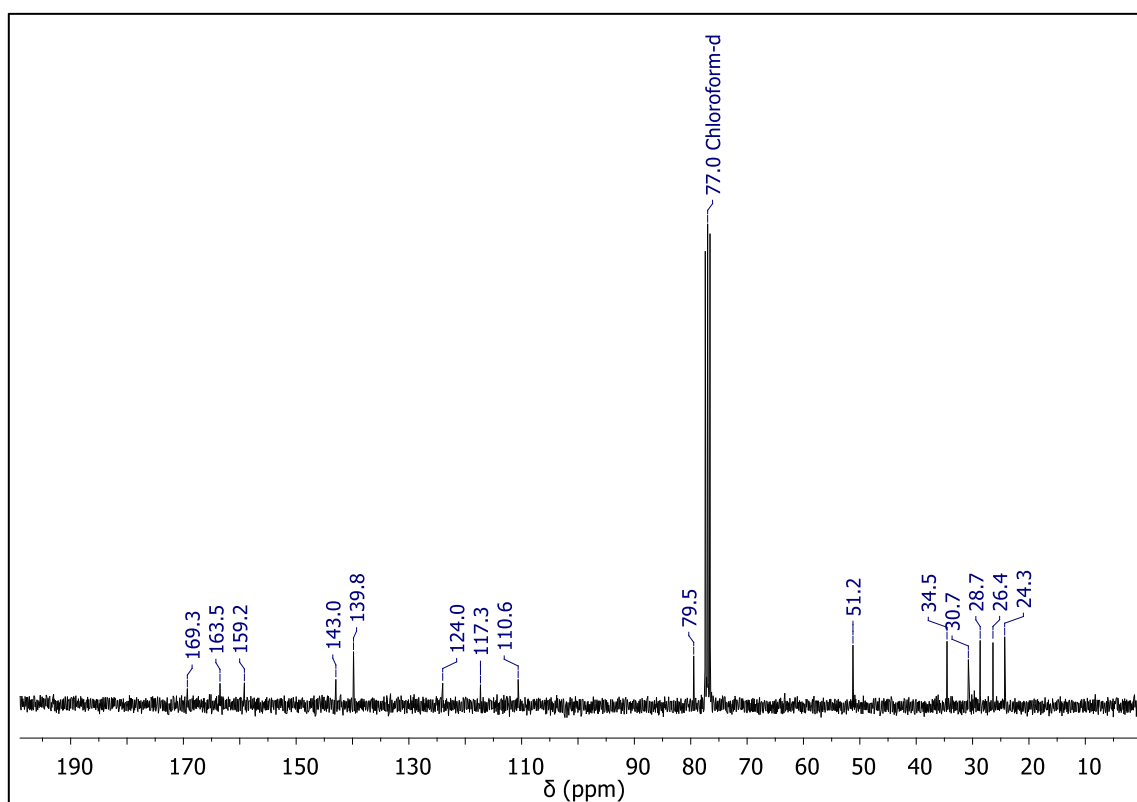
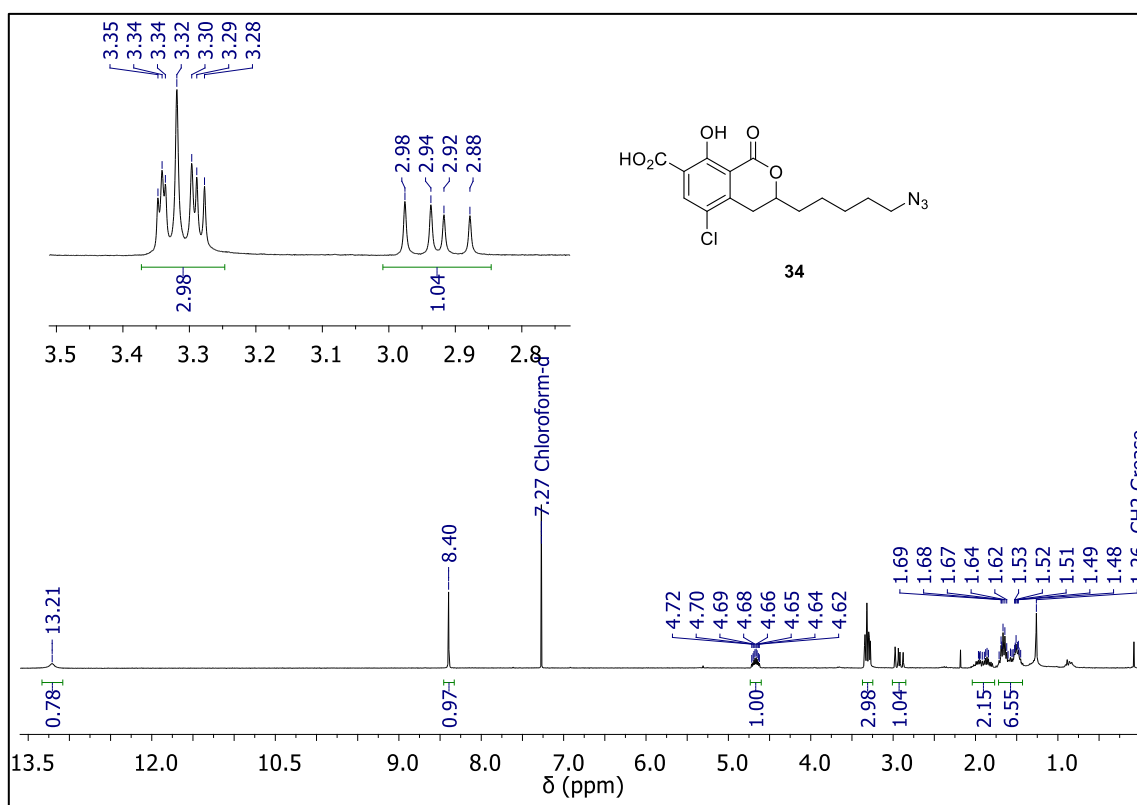
NMR spectra of intermediate **30**.

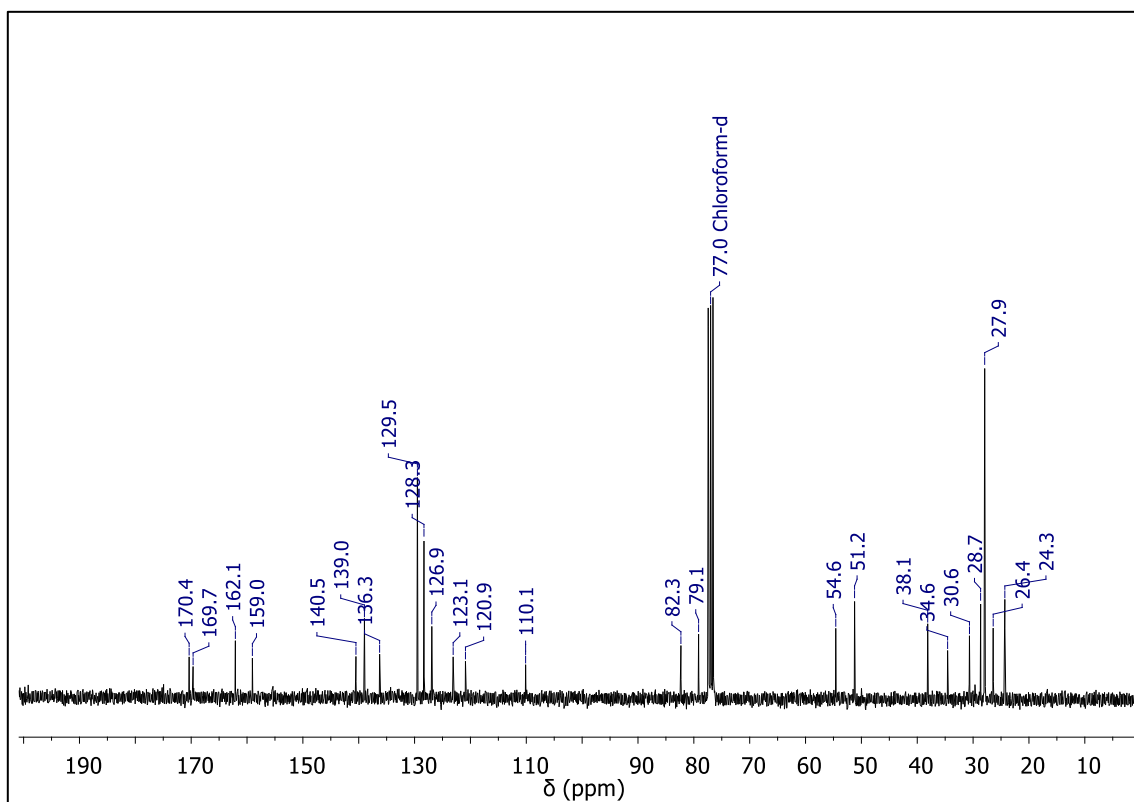
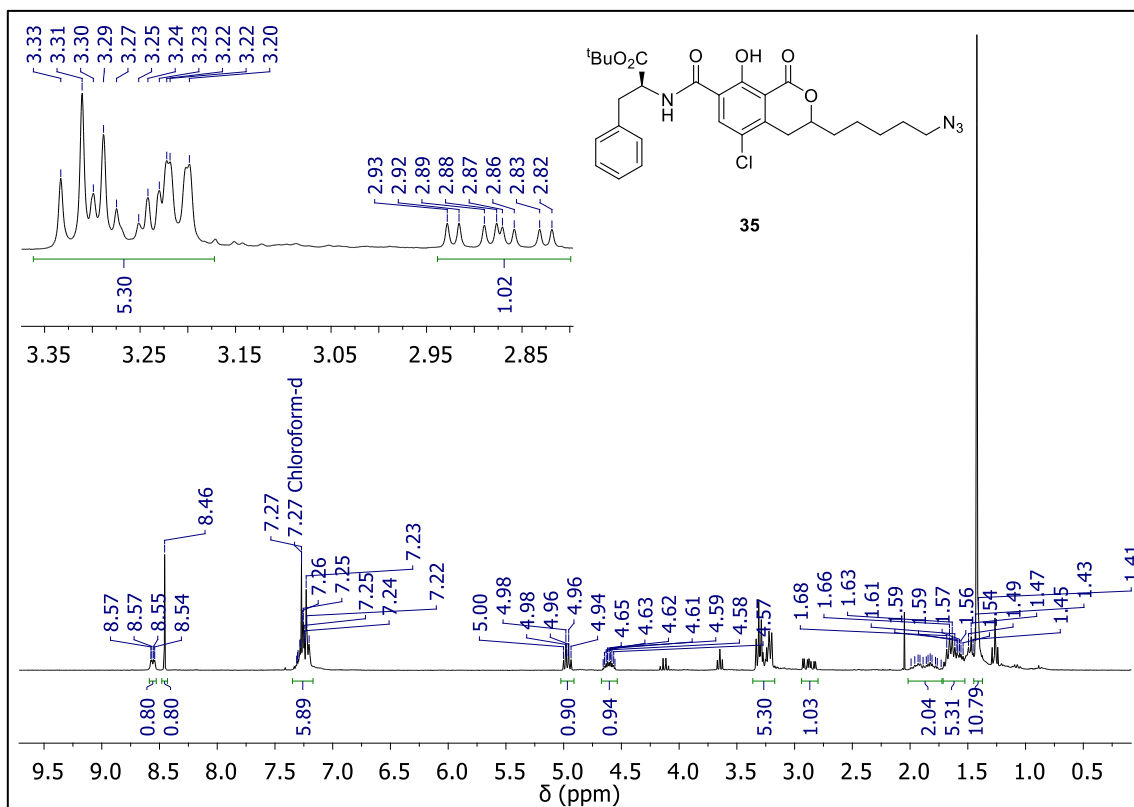
NMR spectra of intermediate **31**.

NMR spectra of Hapten a.

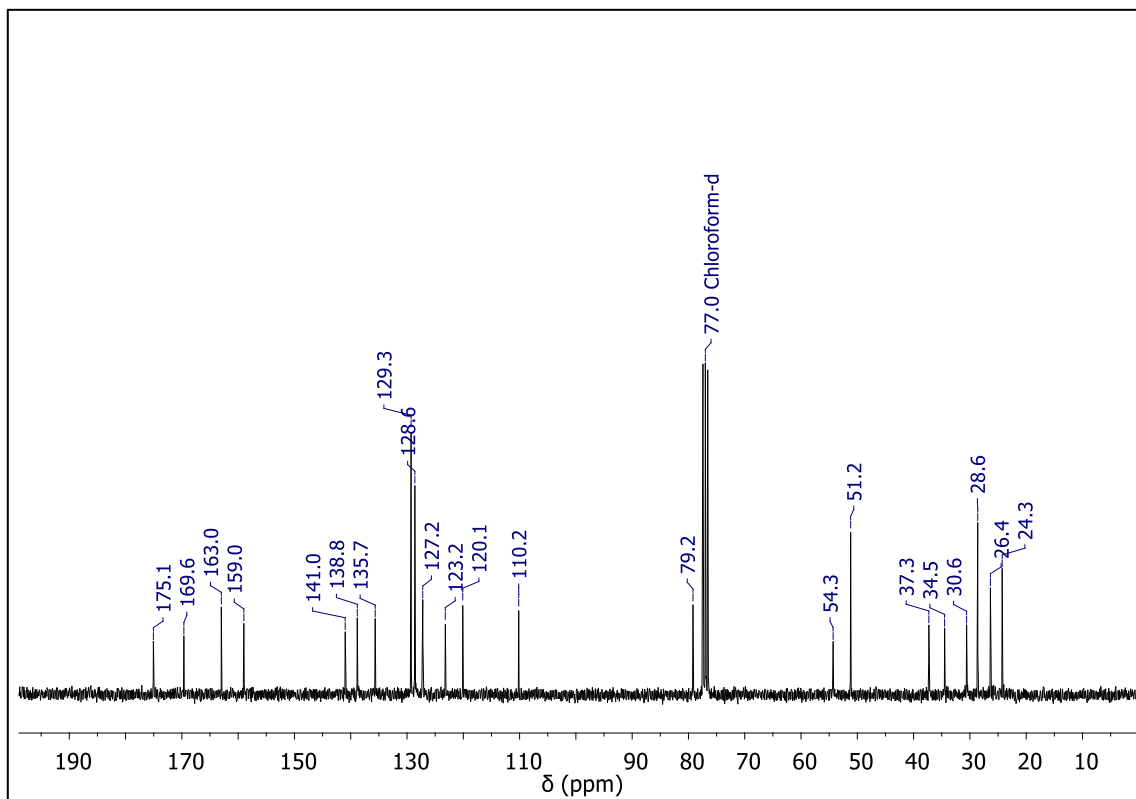
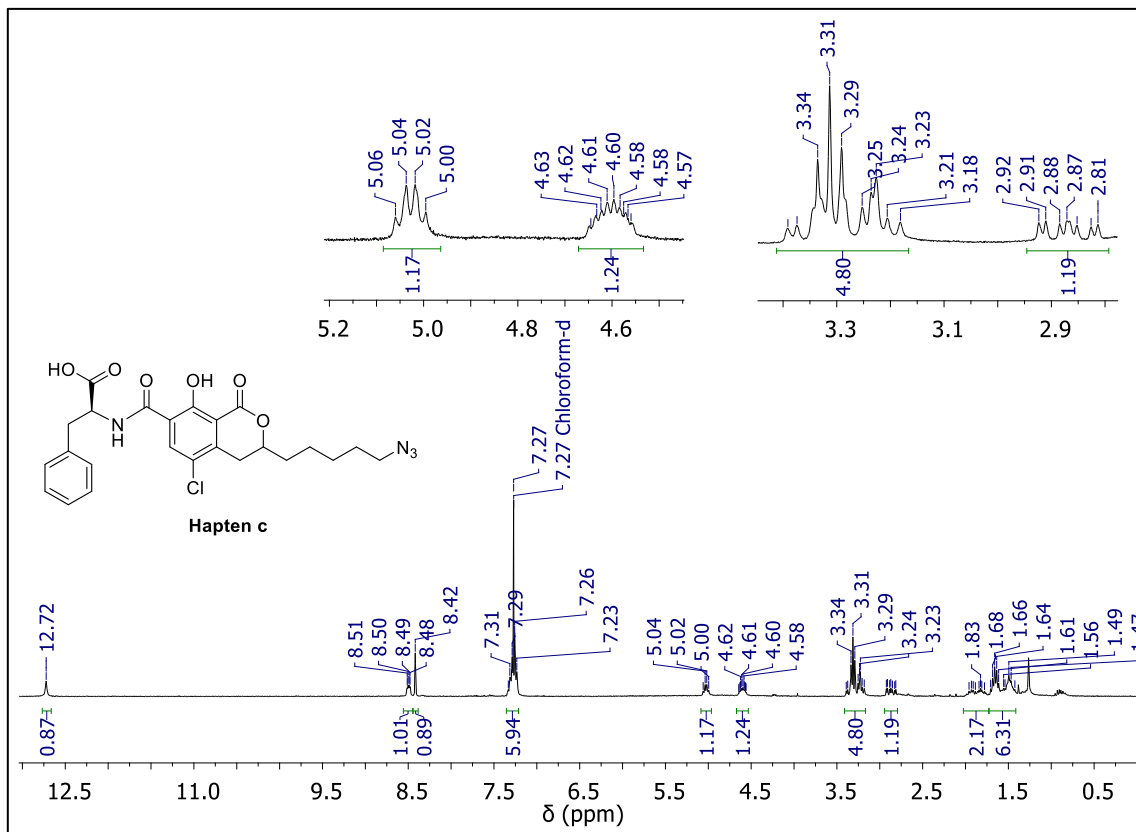


NMR spectra of intermediate **33**.

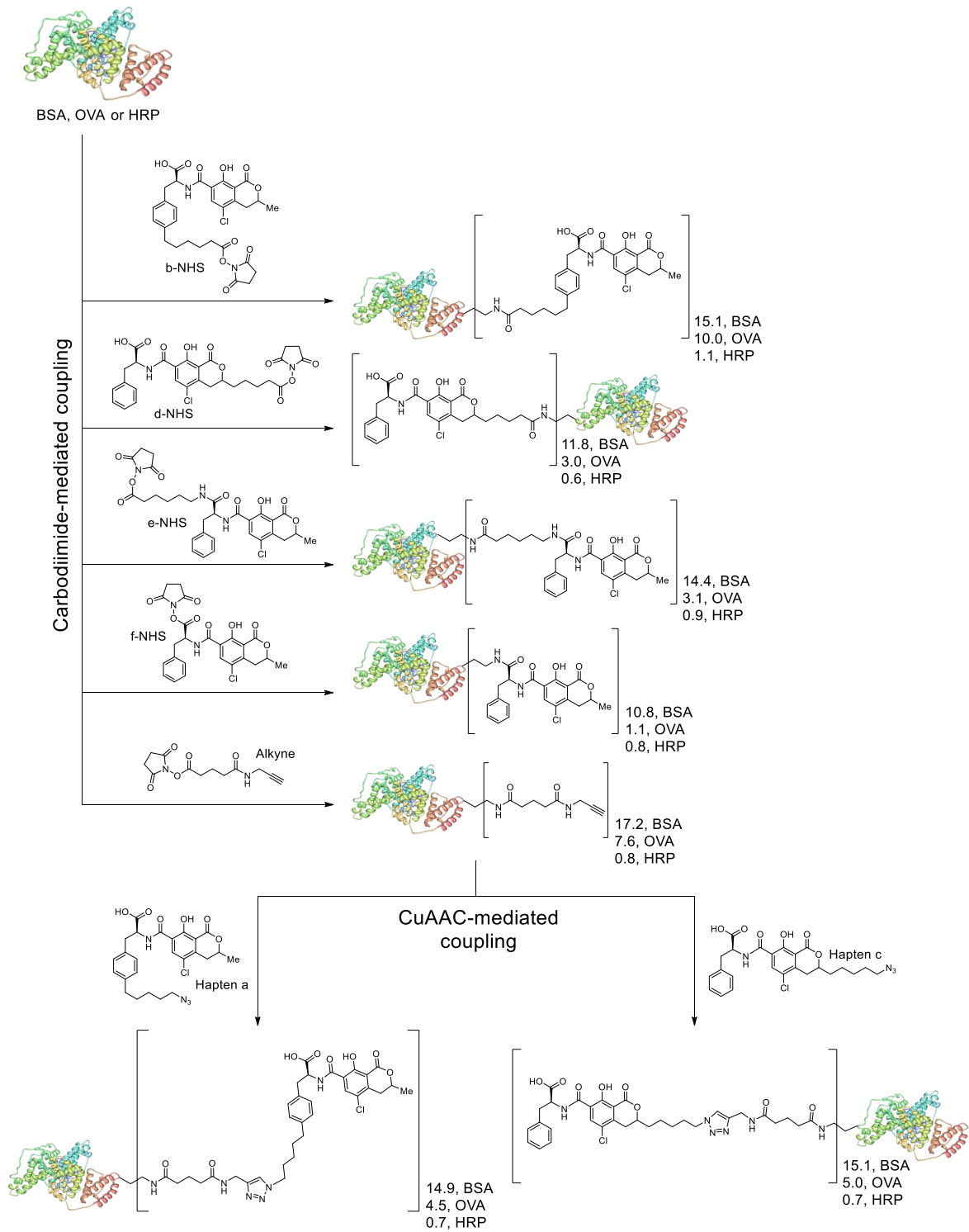
NMR spectra of intermediate **34**.

NMR spectra of intermediate **35**.

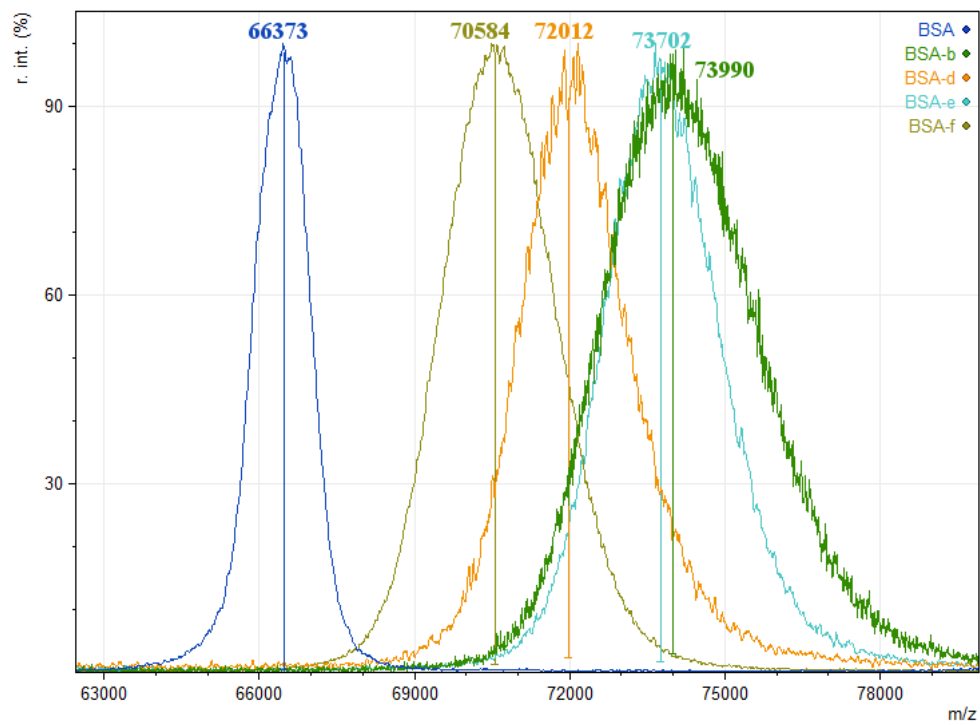
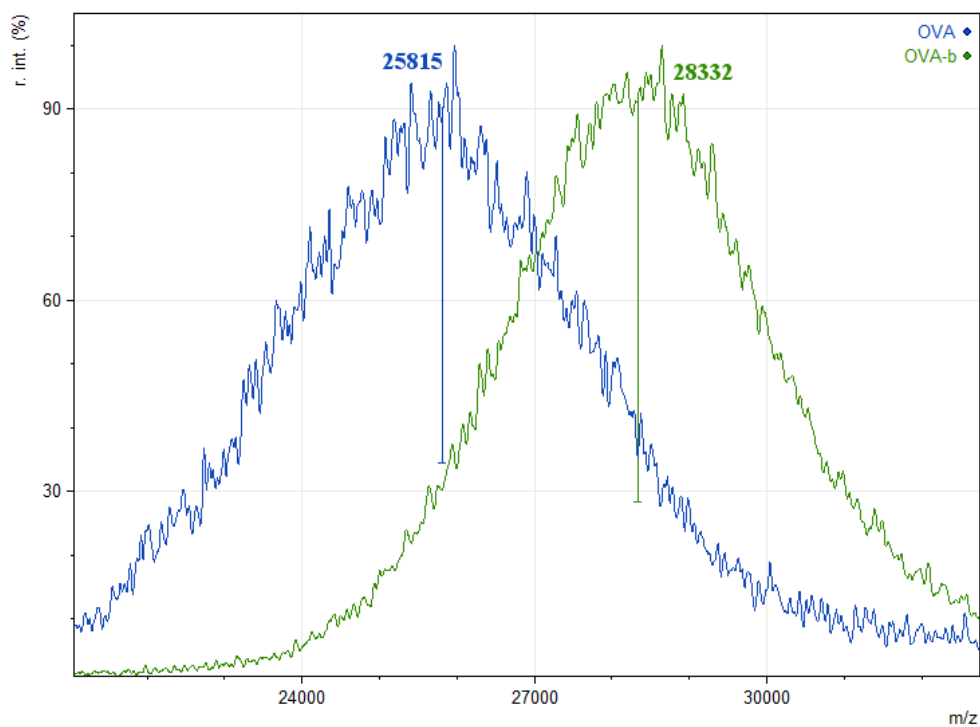
NMR spectra of Hapten c.

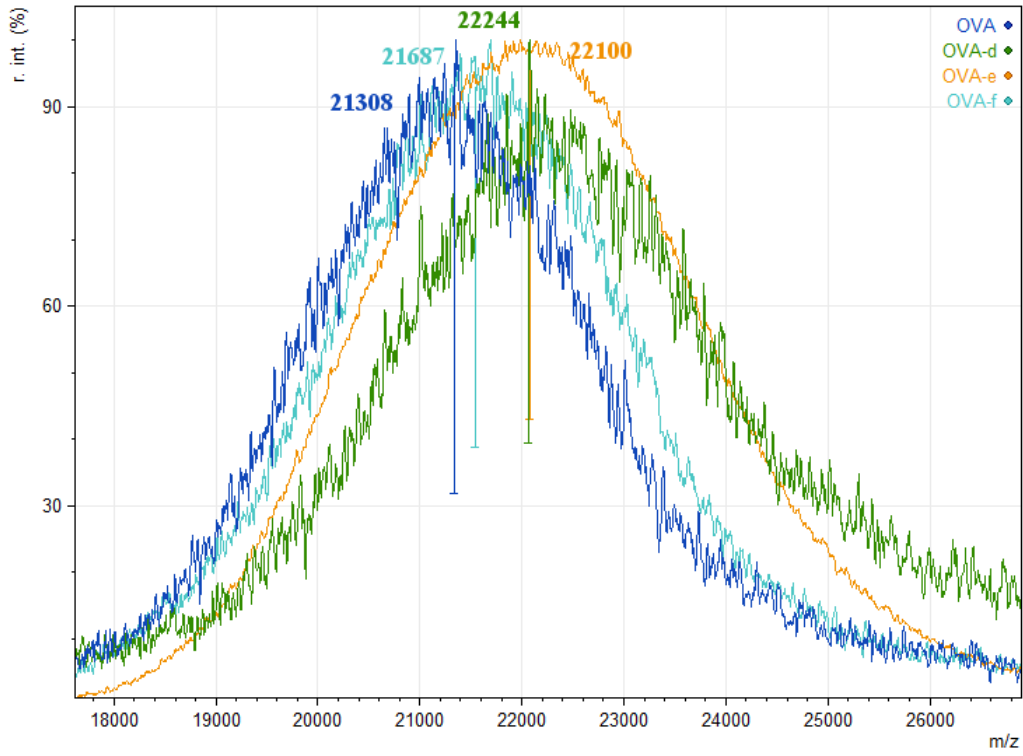


B. MALDI-TOF spectra

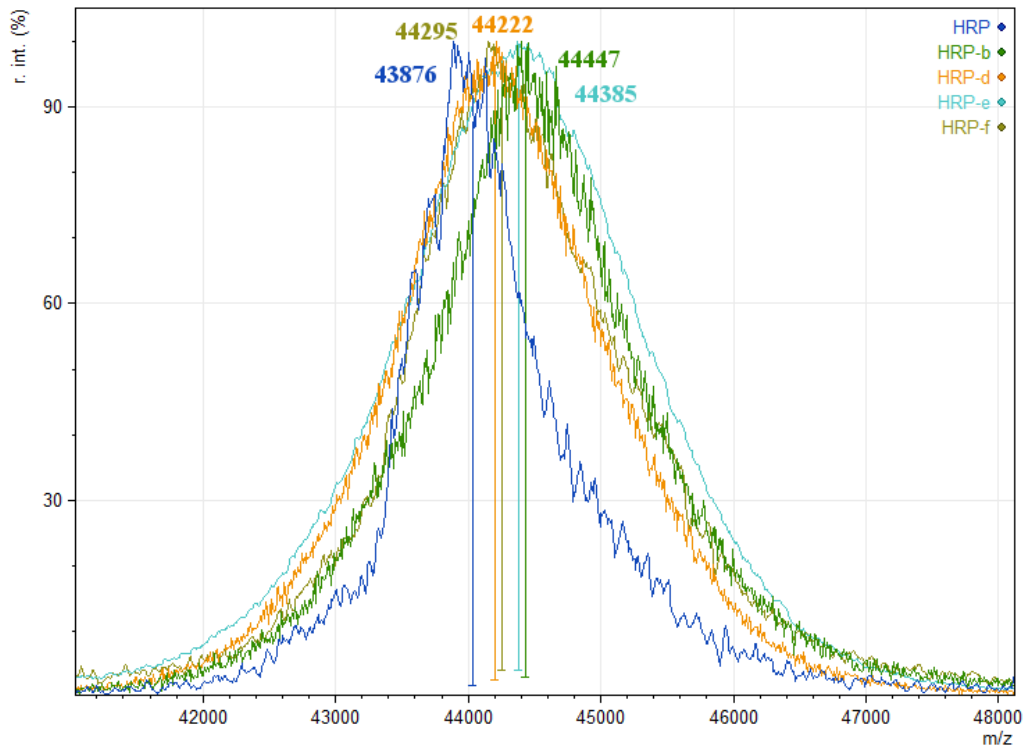


- **Carboxylate-based conjugates**

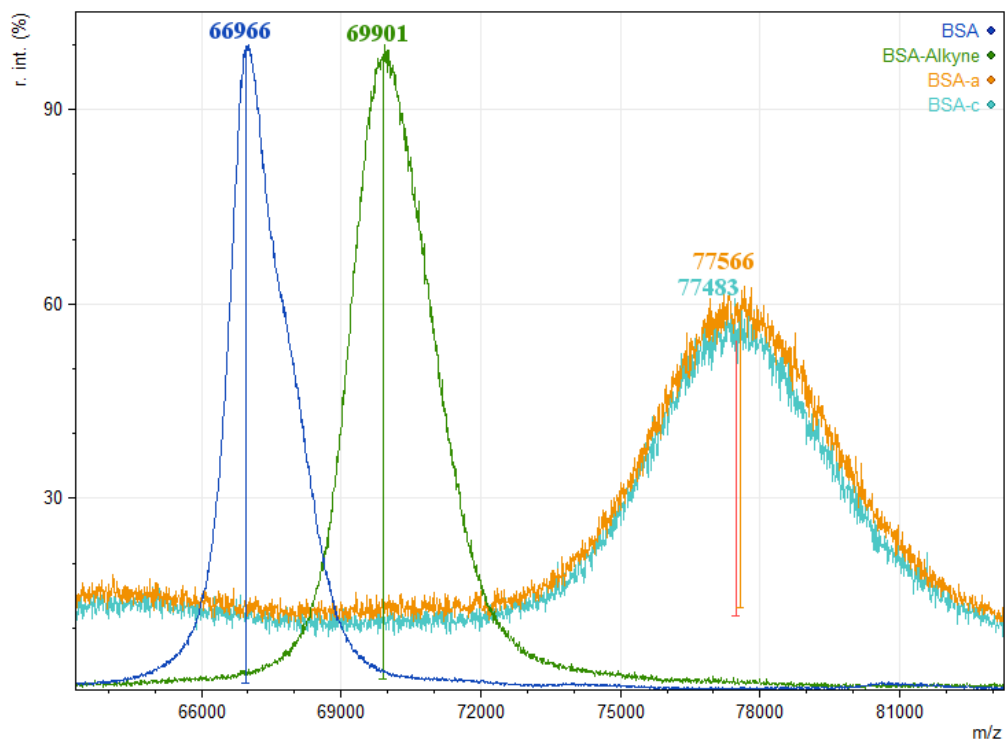
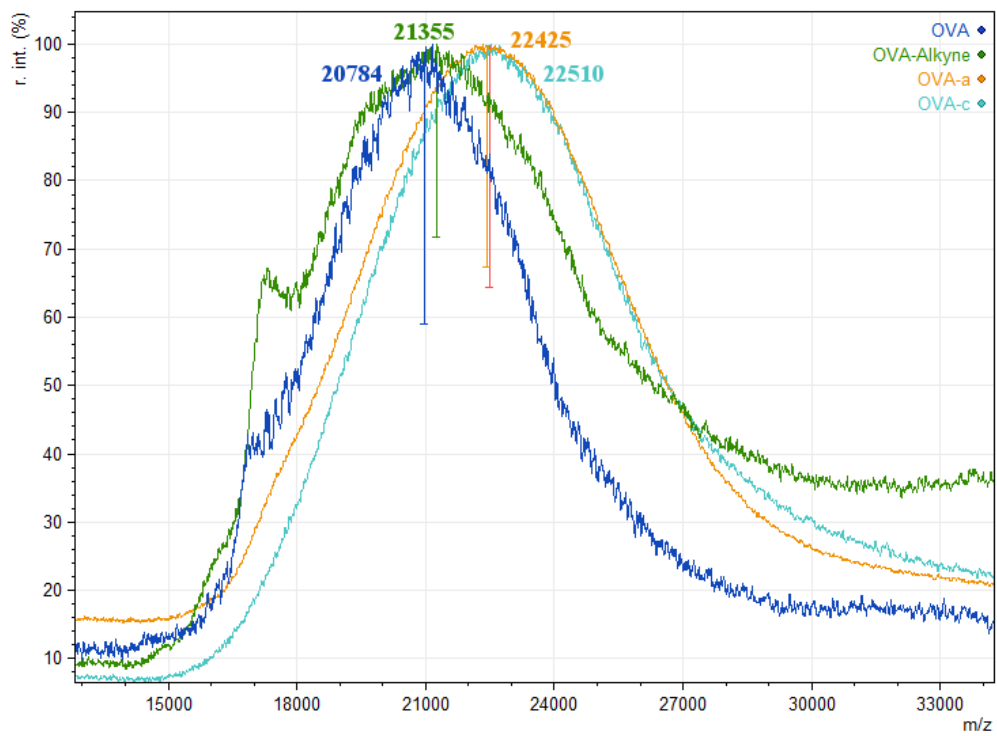
BSA carboxylate-based conjugates**OVA carboxylate-based conjugates**



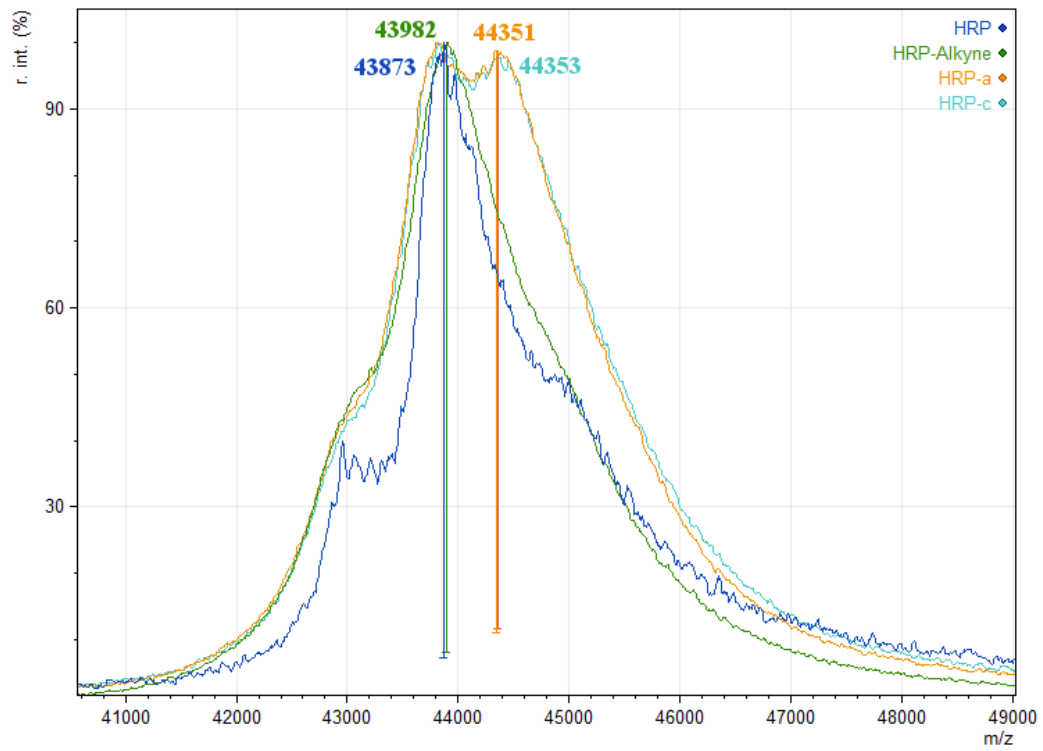
HRP carboxylate-based conjugates



- **Azido-based conjugates**

BSA-azido-based conjugates**OVA azido-based conjugates**

HRP azido-based conjugates



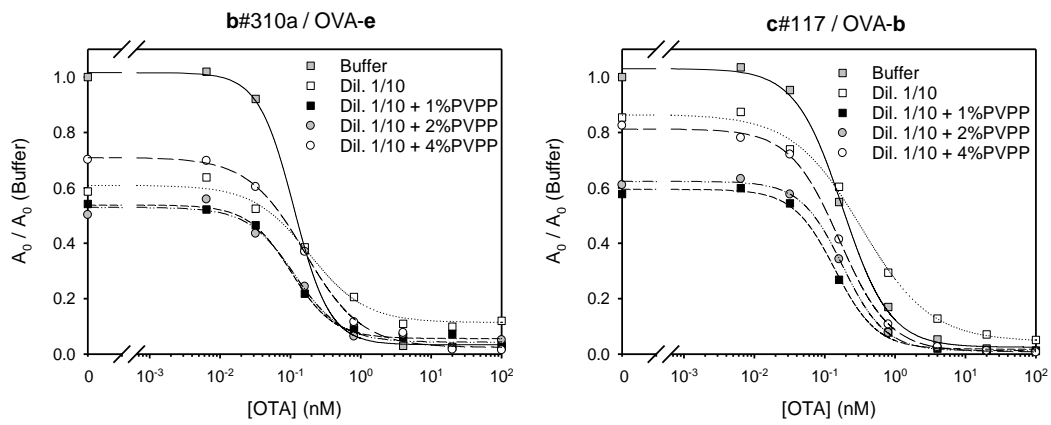
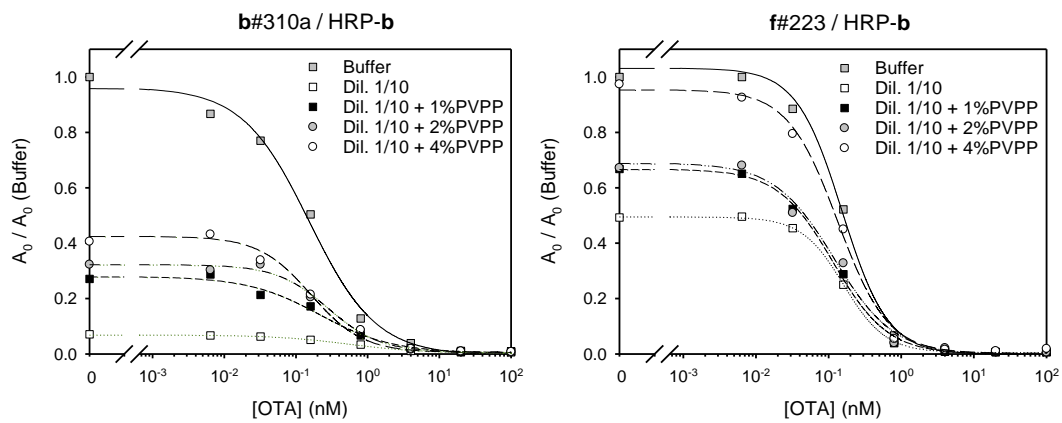
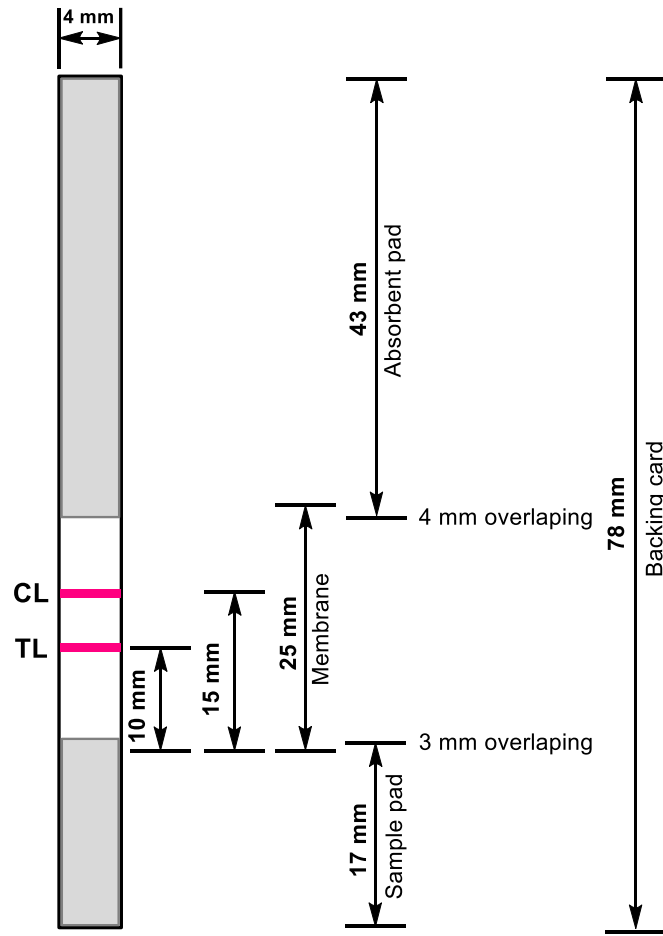
C. ELISA data**INDIRECT ASSAYS****DIRECT ASSAYS**

Figure Annex C.1. Matrix effect of red juice over the selected competitive ELISA tests after buffer dilution and treatment with PVPP. Sample dilutions are referred in assay. Signals were normalised using the maximum signal of the inhibition curve in buffer.

D. Immunostrip scheme



E. OTA commercial kits characteristics

Table Annex E.1. Analytical characteristics of the evaluated ELISA kits.

	ABRAXIS	BioScientific	EuroProxima
IC₅₀ (ng/mL)	0.12	0.07	0.17
CR (%)			
OTB	231	9.3	18
OTC	118	-	-
LOD (ng/mL)			
Dried meat/fish, Feed	5.00	0.15	-
Cocoa	-	0.06	1.70
Milk	-	0.15	-
Pepper, Paprika, Curry, Nutmeg	-	0.15	-
Wine	1.75	0.15	0.30
Roasted coffee	2.50	1.50	1.90
Green coffee	2.50	-	1.20
Urine, Serum	-	0.08	-
Vegetable Oils	-	0.15	-
Beer	0.50	-	-
Cereal, Oats	1.20	0.15	1.70

F. Patent and publications

Preparation of new bioconjugates and antibodies for the immunodetection of ochratoxin A. A. Abad-Fuentes, Josep V. Mercader, Antonio Abad-Somovilla, Consuelo Agulló & Daniel López-Puertollano. WO2018091756 (A1), **2018**.

Novel haptens and monoclonal antibodies with subnanomolar affinity for a classical analytical target, ochratoxin A. Daniel López-Puertollano, Josep V. Mercader, Consuelo Agulló, Antonio Abad-Somovilla & Antonio Abad-Fuentes. *Scientific Reports*, **2018**, *8*, 9761.

Combined heterologies for monoclonal antibody-based immunoanalysis of fluxapyroxad. Eric Ceballos-Alcantarilla, Daniel López-Puertollano, Consuelo Agulló, Antonio Abad-Fuentes, Antonio Abad-Somovilla & Josep V. Mercader. *Analyst*, **2018**, *143*, 5718.

Study of epitope imprinting for small templates: preparation of NanoMIPs for ochratoxin A. Daniel López-Puertollano, Todd Cowen, Álvaro García-Cruz, Elena Piletska, Antonio Abad-Somovilla, Antonio Abad-Fuentes & Sergey Piletsky. *ChemNanoMat*, **2019**, *5*, 651–657.

Click chemistry-assisted bioconjugates for hapten immunodiagnosics. Daniel López-Puertollano, Consuelo Agulló, Josep V. Mercader, Antonio Abad-Somovilla & Antonio Abad-Fuentes. *Bioconjugate Chemistry*, **2020**, *31*, 956-964.

