

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2013/053969 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
18 de abril de 2013 (18.04.2013) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C07K 14/00 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)  
C07D 239/22 (2006.01) C12N 9/08 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01)  
G01N 33/532 (2006.01) C12N 9/38 (2006.01)

(Valencia) (ES). **ABAD SOMOVILLA, Antonio**; Universitat de Valencia, Avenida Vicente Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). **AGULLO BLANES, Consuelo**; Universitat de Valencia, Avenida Vicente Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2012/070704

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

(22) Fecha de presentación internacional:  
10 de octubre de 2012 (10.10.2012)

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

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201131641  
13 de octubre de 2011 (13.10.2011) ES

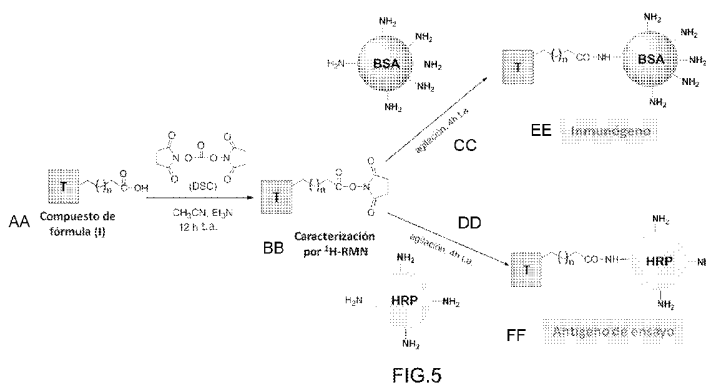
(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSITAT DE VALENCIA** [ES/ES]; Avenida Vicente Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: HAPTENS, CONJUGATES AND ANTIBODIES FOR THE FUNGICIDE CYPRODINIL

(54) Título : HAPTENOS, CONJUGADOS Y ANTICUERPOS PARA EL FUNGICIDA CIPRODINIL



AA Compound of formula (I)  
BB Characterisation by <sup>1</sup>H-RMN  
CC, DD Stirring 4 h ambient temperature  
EE Immunogen  
FF Test antigen

(57) Abstract: The invention relates to haptens, conjugates, labelled derivatives and antibodies for cyprodinil. Likewise, the present invention also relates to the use of cyprodinil conjugates as test antigens or immunogens for obtaining antibodies of said fungicide, and to the use of the labelled derivatives of cyprodinil as test antigens. Furthermore, the present invention also relates to a method for analysing cyprodinil using the thus obtained antibodies, at times together with the test antigens, which are conjugates or labelled derivatives. The invention also provides a kit for analysing cyprodinil, which includes antibodies of said fungicide, at times together with test antigens, which are conjugates or labelled derivatives.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

WO 2013/053969 A1

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, **Publicada:**  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). — *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

---

Haptenos, conjugados y anticuerpos para el fungicida ciprodinil La presente invención se refiere a haptenos, conjugados, derivados marcados y anticuerpos para ciprodinil. Así mismo, la presente invención también se refiere al uso de conjugados de ciprodinil como antígenos de ensayo o inmunógenos para obtener anticuerpos de este fungicida; y al uso de los derivados marcados de ciprodinil como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere a un método de análisis de ciprodinil utilizando los anticuerpos obtenidos, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados. Esta invención también proporciona un kit para analizar ciprodinil que comprende anticuerpos de este fungicida, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados.

## **Haptenos, conjugados y anticuerpos para el fungicida** **ciprodinil**

La presente invención se refiere a haptenos, conjugados, derivados marcados y anticuerpos para ciprodinil. Así mismo, la presente invención también se refiere al uso de conjugados de ciprodinil como antígenos de ensayo o inmunógenos para obtener anticuerpos de este fungicida; y al uso de los derivados marcados de ciprodinil como antígenos de ensayo. Además, la presente invención también se refiere a un método de análisis de ciprodinil utilizando los anticuerpos obtenidos, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados. Esta invención también proporciona un kit para analizar ciprodinil que comprende anticuerpos de este fungicida, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los fungicidas son el grupo de plaguicidas que con mayor frecuencia aparece en los programas de vigilancia y control. Esto es así no sólo por su elevado uso, sino principalmente porque estos productos de protección vegetal se emplean para combatir las infecciones causadas por hongos en momentos muy próximos a la cosecha o incluso con posterioridad (fungicidas postcosecha). Este hecho incrementa considerablemente la probabilidad de que residuos de dichos tratamientos permanezcan cuando el alimento llegue al consumidor, lo que obliga a los organismos de regulación y control a estar más vigilantes e idealmente a aumentar los controles. Los ataques por hongos en frutos almacenados constituyen uno de los motivos principales de pérdidas económicas en agricultura. El uso intensivo de fungicidas convencionales, como el tiabendazol o el imazalil, ha llevado en los últimos años a la aparición de cepas resistentes y por tanto a una menor eficacia de los tratamientos con estos productos. Ante esta circunstancia, las empresas agroquímicas pusieron en marcha programas de I+D encaminados a desarrollar nuevos productos que

presentaran mecanismos de acción innovadores y que permitieran combatir de forma eficaz las infecciones fúngicas, al tiempo que fueran seguros y compatibles con los programas de gestión integrada de plagas. Estos productos están comenzando a sustituir progresivamente a los productos más antiguos, que resultan menos aceptables desde un punto de vista toxicológico y medioambiental.

Entre los fungicidas más relevantes desarrollados en la última década destaca el ciprodinil [4-ciclopropil-6-metil-*N*-fenilpirimidin-2-amina]. Este plaguicida pertenece a la familia de las anilinopirimidinas cuyo modo bioquímico de acción es común y diferente al del resto de fungicidas. El ciprodinil, desarrollado por NovartisCropProtection (actualmente Syngenta AG), se incluyó en el Anexo I de la UE en 2006 y actualmente se comercializa bajo los nombres Unix y Vanguard. Pero sin duda su aplicación agronómica de mayor impacto deriva de su comercialización bajo la denominación Switch, en la que se formula conjuntamente con fludioxonil, otro fungicida pero con un modo de acción diferente. Entre los cultivos para los que la UE ha establecido límites máximos de residuos de forma explícita para ciprodinil se encuentran el trigo (0.5 ppm), frutas de pepita (1 ppm), frutas de hueso (0.5-2.0 ppm), uva (5 ppm), fresas (5 ppm), solanáceas (0.5-1.0 ppm), cucurbitáceas (0.5 ppm), apionabos (0.3 ppm) y espinacas (8 ppm), además de una gran variedad de hortalizas de hoja ancha (10 ppm).

Las metodologías analíticas empleadas para el análisis de estos fungicidas son fundamentalmente de tipo instrumental, en especial cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a diferentes detectores según el tipo de compuesto a analizar y la sensibilidad requerida. Estas técnicas se caracterizan por su capacidad para analizar simultáneamente varios residuos con una elevada precisión y exactitud. Sin embargo, pese a que resultan imprescindibles en muchas circunstancias, con frecuencia implican la utilización de metodologías laboriosas y de elevado coste, que deben realizarse por personal altamente cualificado en laboratorios

centralizados bien equipados y habitualmente alejados de las zonas de producción. Estas limitaciones condicionan la idoneidad de estas técnicas para acometer el análisis de grandes números de muestras y para obtener resultados en breve plazo, dos aspectos que contribuirían a garantizar la seguridad de los alimentos comercializados y a la realización de estudios más exhaustivos sobre la exposición de los consumidores a estos fungicidas a través de los alimentos.

Los inmunoensayos son técnicas bioanalíticas basadas en la interacción de un antígeno (el analito) con un anticuerpo que lo reconoce específicamente. No obstante, un plaguicida es una molécula orgánica pequeña que constituye un único sitio de unión al anticuerpo, por lo que en este tipo de técnicas analíticas la interacción entre el analito y el anticuerpo se realiza por desplazamiento de la unión entre el anticuerpo y un análogo marcado del analito. De este modo, en presencia del analito se establece una competencia entre éste y el análogo marcado por la unión al anticuerpo. Habitualmente, el marcaje se realiza con una actividad enzimática, dando así lugar a los enzimoensayos. Cuando además uno de los participantes en la reacción se encuentra inmovilizado sobre un soporte sólido, la técnica se denomina ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Los primeros inmunoensayos enzimáticos para plaguicidas se desarrollaron durante la primera mitad de los años 80. Desde entonces hasta la actualidad el número de plaguicidas para los cuales se han desarrollado inmunoensayos ha aumentado espectacularmente, suponiendo varias decenas y cubriendo los principales grupos de compuestos: insecticidas, herbicidas y fungicidas. De hecho, un gran número de estos ensayos están disponibles comercialmente en forma de kits con diferentes formatos. La creciente aceptación de los inmunoensayos como técnicas complementarias a las cromatográficas para el análisis de pequeñas moléculas orgánicas se debe a que se trata de una metodología sencilla, rápida y de bajo coste, exhibiendo al mismo tiempo una elevada sensibilidad y especificidad. Los inmunoensayos permiten detectar específicamente el analito diana en mezclas muy complejas, simplificando considerablemente los laboriosos procedimientos de preparación

de la muestra, lo que a su vez redundará en un aumento en la capacidad de muestreo. Además, los inmunoensayos pueden realizarse en formatos portátiles, lo que los independiza de los laboratorios centralizados y los convierte en idóneos para el análisis en los puntos de producción. Las excelencias analíticas atribuidas a los inmunoensayos ya han sido demostradas en muchas aplicaciones prácticas, donde han competido favorablemente con las técnicas cromatográficas [M.C. Hennion, *Analysis* 1998, 26,149–155; A. Abad et al., *J. Chromatogr. A*1999, 833, 3–12; A. Abad et al., *J. Agric. Food Chem.*2001, 49, 1707–1712; N.A. Lee y I.R. Kennedy, *J. AOAC Int.* 2001, 84, 1393–1406; F.A. Esteve-Turrillas et al., *Anal. Chim. Acta* 2010, 682, 93–103].

Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la utilización de la tecnología de inmunoensayo para analizar el contenido del fungicida ciprodinil en una muestra.

Por lo tanto, existe una necesidad, en particular en la industria alimentaria y/o agrícola, de desarrollar un método analítico que permita la determinación o detección mediante la tecnología de inmunoensayo de ciprodinil, fungicida ampliamente utilizado en la actualidad, preferentemente mediante la utilización de un kit que comprenda al menos un anticuerpo de ciprodinil.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona haptenos de ciprodinil, compuestos de fórmula (I), que presentan una funcionalización adecuada, en diferentes posiciones de la molécula, para la obtención de conjugados de ciprodinil o derivados marcados de ciprodinil.

Los conjugados de ciprodinil, compuestos de fórmula (II), pueden actuar como inmunógenos para la obtención de anticuerpos para ciprodinil o como antígenos de ensayo útiles para detectar este fungicida mediante inmunoensayos competitivos. Los conjugados de ciprodinil funcionalizados en diferentes posiciones presentan características diferentes, así los inventores

han encontrado que no todas las posiciones reactivas de la molécula de ciprodinil son adecuadas para la obtención de conjugados con buenas propiedades inmunogénicas.

La presente invención también proporciona derivados marcados de ciprodinil, compuestos de fórmula (III), útiles como antígenos de ensayo en inmunoensayos competitivos.

La presente invención también se refiere a anticuerpos con elevada afinidad y selectividad hacia ciprodinil, así como a un método de análisis de ciprodinil utilizando dichos anticuerpos, en ocasiones junto a conjugados o derivados marcados como antígenos de ensayo.

Finalmente, la presente invención también proporciona un kit para analizar ciprodinil que comprende anticuerpos de este fungicida, opcionalmente, junto a conjugados o derivados marcados como antígenos de ensayo.

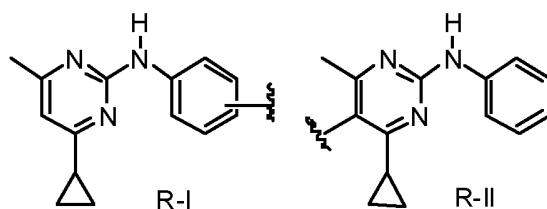
Un primer aspecto de la presente invención describe un compuesto de fórmula (I):

**T-L-Y**  
**(I)**

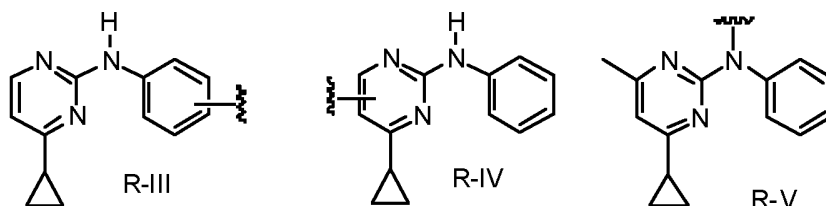
caracterizado porque

**T** se selecciona del grupo que consiste en **R-I**, **R-II**, **R-III**, **R-IV** y **R-V**;

20



25



donde

**R-I** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

5 **R-II** es [4-ciclopropil-6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo];

**R-III** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

10 **R-IV** se selecciona del grupo que consiste en [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y [4-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo]; y

**R-V** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

**L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

**Y** es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en: -COOH, -NH<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>Br, -CH<sub>2</sub>I, -CHO, -SH, -SO<sub>3</sub>H, -OSO<sub>2</sub>Ph, -NH-NH<sub>2</sub>, -OSO<sub>2</sub>Ar y -C≡CH;

con la condición de que:

20 a) cuando **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], el fragmento-**L-Y** es diferente de -SCH<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>COOH;

b) cuando **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y **L** es -CH<sub>2</sub>-, **Y** es diferente a -NH<sub>2</sub>; y

25 c) cuando **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino], **L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada, con la condición de que dicha cadena hidrocarbonada no comprende ningún heteroátomo.

En la presente solicitud de patente se entiende por arilo (-Ar) un grupo carbocíclico aromático con un único anillo, por ejemplo fenilo, múltiples anillos, por ejemplo bifenilo, o múltiples anillos condensados donde al menos uno de ellos es aromático, por ejemplo 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1-naftilo, 2-naftilo. El



grupo arilo puede estar sustituido o no. Preferentemente, el grupo arilo es 4-metilfenilo.

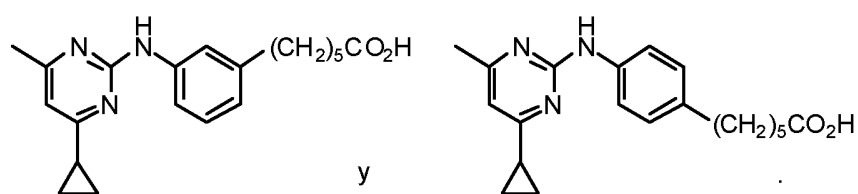
Según una realización preferida, el compuesto de fórmula (I) se caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono.

5 Preferentemente, dicha cadena hidrocarbonada lineal comprende entre 2 y 8 átomos de carbono.

Según otra realización preferida adicional, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque **Y** se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{SH}$ . Preferentemente, el compuesto de  
10 fórmula (I) objeto de la presente invención se caracteriza porque **Y** es  $-\text{COOH}$ .

Según otra realización preferida, el compuesto de formula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono; e **Y** se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{SH}$ . Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se  
15 caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono.

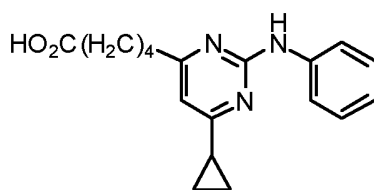
Según una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (I) de  
20 esta invención se selecciona del grupo que consiste en



Según otra realización preferida adicional, el compuesto de formula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal  
25

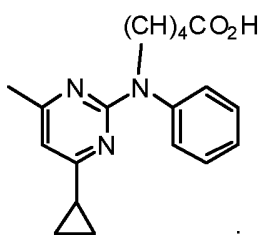
de 1 a 20 átomos de carbono; e **Y** se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -NH<sub>2</sub> y -SH. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono.

- 5 Según una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (I) de esta invención es



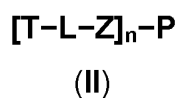
- 10 Según otra realización preferida adicional, el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono; e **Y** se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -NH<sub>2</sub> y -SH. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono.

- 15 Según una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (I) de esta invención es



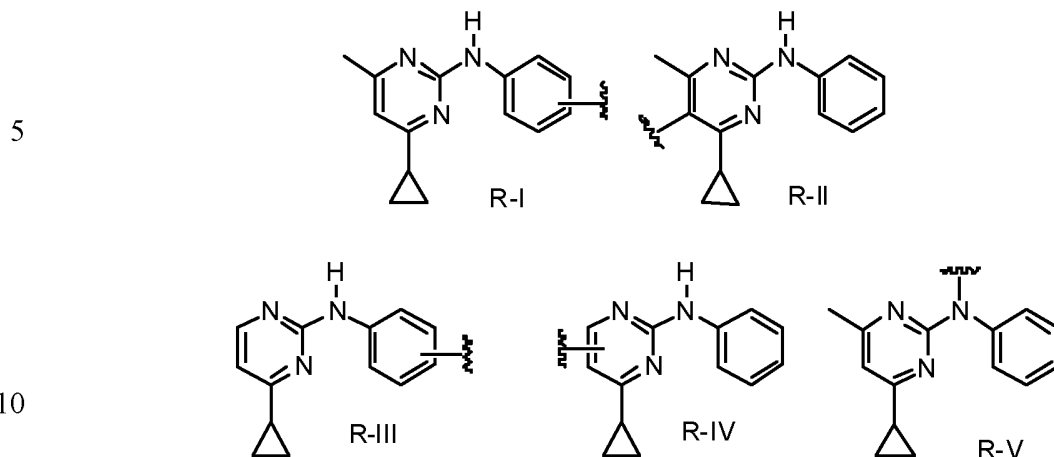
Un segundo aspecto de la presente invención describe un compuesto de fórmula (II):

20



caracterizado porque

**T** se selecciona del grupo que consiste en **R-I**, **R-II**, **R-III**, **R-IV** y **R-V**;



donde

**R-I** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

**R-II** es [4-ciclopropil-6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo];

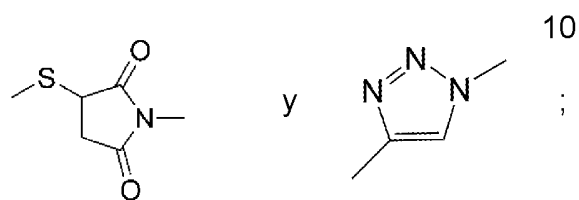
**R-III** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

**R-IV** se selecciona del grupo que consiste en [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y [4-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo]; y

**R-V** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

**L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

**Z** es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NHCONH-, -NHCSNH-, -OCONH-, -NHOCO-, -OCSNH-, -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -OCO-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH-, -NR-;



**P** es un polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor de 2000 daltons; y

**n** es un número con un valor entre 1 y 500;

con la condición de que:

a) cuando **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], el fragmento **-L-Z-** es diferente de  $-\text{SCH}_2\text{CHNH}_2\text{COO}-$ ,  $-\text{SCH}_2\text{CHNH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$  o  $-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCO}-$ ;

b) cuando **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y **L** es  $-\text{CH}_2-$ , **Z** es diferente a  $-\text{NHCO}-$ ; y

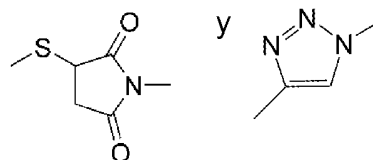
c) cuando **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino], **L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada, con la condición de que dicha cadena hidrocarbonada no comprende ningún heteroátomo.

El valor de **n** indica el grado de conjugación, es decir la relación molar entre la fracción derivada del compuesto de fórmula (I) y **P**, el polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor de 2000 daltons en el compuesto de fórmula (II) resultante.

El compuesto de fórmula (II) de la presente invención puede utilizarse como inmunógeno para la producción de anticuerpos o como antígeno de ensayo, junto con un anticuerpo de ciprodinil, para determinar o detectar este fungicida en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo competitivo.

Según una realización preferida, el compuesto de fórmula (II) se caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono. Preferentemente, dicha cadena hidrocarbonada lineal comprende entre 2 y 8 átomos de carbono.

Según otra realización preferida adicional, el compuesto de fórmula (II) de la presente invención se caracteriza porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-



5 Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) objeto de la presente invención se caracteriza porque **Z** es -CONH-.

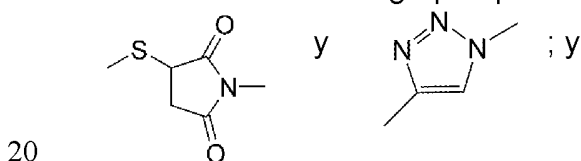
Según otra realización preferida de la presente invención, el compuesto de fórmula (II) descrito en esta solicitud de patente se caracteriza porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa. Preferentemente, cuando **P** es albúmina, es albúmina de huevo o albúmina sérica.

Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (II) de la presente invención se caracteriza porque

15 **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



**P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

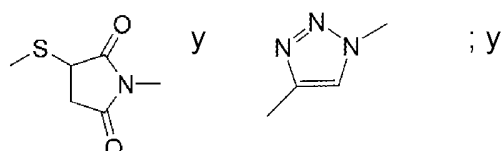
Según una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (II) de la presente invención se caracteriza porque **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 5 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Según otra realización preferida, el compuesto de formula (II) de la presente invención se caracteriza porque

**T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

5 **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



10 **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

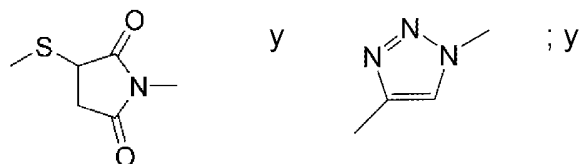
Según una realización aún más preferida, el compuesto de formula (II) de la presente invención se caracteriza porque **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Según otra realización preferida, el compuesto de formula (II) de la presente invención se caracteriza porque

**T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

20 **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



25 **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

Según una realización aún más preferida, el compuesto de formula (II) de la presente invención se caracteriza porque **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de

carbono; **Z** es -CONH-; **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Un tercer aspecto de la presente invención describe un compuesto de fórmula (III):



caracterizado porque

10 **T**, **L** y **Z** tienen el mismo significado definido anteriormente para el compuesto de fórmula (II);

**Q** es un marcador no isotópico; y

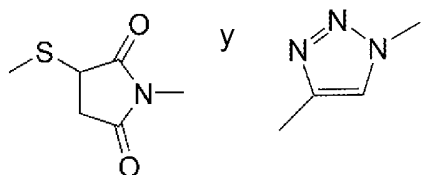
**m** es un número entero con un valor entero entre 1 y 1000.

15 En la presente invención se entiende por marcador cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica analítica. En la presente invención, **Q** del compuesto de fórmula (III) identifica un fragmento o una molécula química detectora, marcadora o trazadora.

Este compuesto de fórmula (III) puede utilizarse como antígeno de ensayo junto con un anticuerpo de ciprodinil para determinar o detectar este fungicida en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo competitivo.

20 Según una realización preferida, el compuesto de fórmula (III) se caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono. Preferentemente, **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono.

25 Según otra realización preferida adicional, el compuesto de fórmula (III) de la presente invención se caracteriza porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



Preferentemente, el compuesto de fórmula (III) se caracteriza porque **Z** es -CONH-.

Según otra realización preferida adicional, el compuesto de fórmula (III) de la presente invención se caracteriza porque **Q** es biotina, un compuesto  
5 luminiscente, un fluoróforo, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta, micro o nanopartículas u otros.

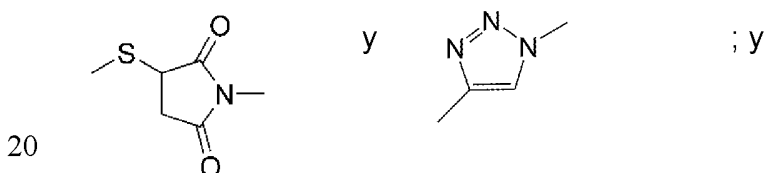
Preferentemente, **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio,  
10 luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (III) de la presente invención se caracteriza porque

**T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4-ciclopropil-6-  
15 metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



**Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno  
25 cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

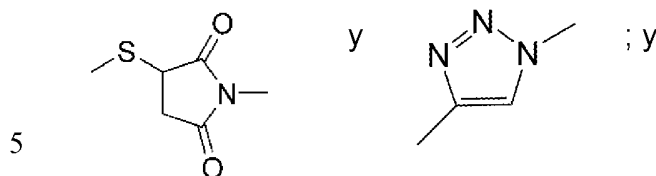
Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (III) de la presente invención se caracteriza porque

**T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo];



**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



**Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

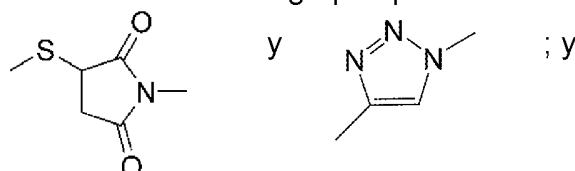
10

Según otra realización preferida, el compuesto de formula (III) de la presente invención se caracteriza porque

**T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

15 **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



**Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

25 Un cuarto aspecto de la presente invención describe un anticuerpo generado en respuesta a un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en esta solicitud de patente.

Según una realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque

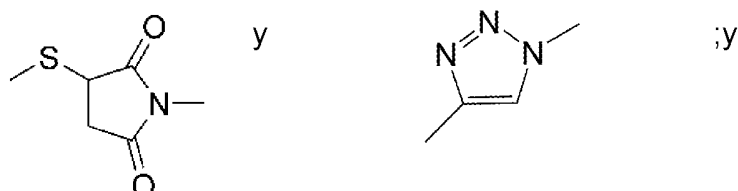
30

**T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,

5



**P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina.

10

Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente, se caracteriza porque **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 5 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** es albumina; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

15

Según otra realización preferida adicional de la invención, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque

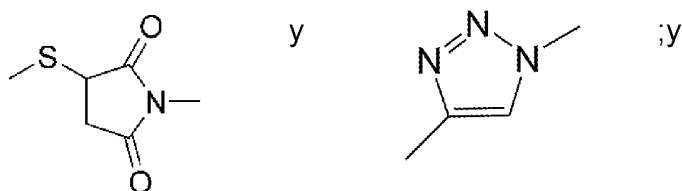
20

**T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,

25



**P** se selecciona dentro del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina.

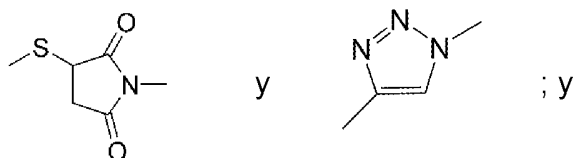
Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente, se caracteriza porque **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** es albúmina; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Según otra realización preferida adicional de la invención, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque

**T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



15

**P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina y hemocianina.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente, se caracteriza porque **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** es albúmina; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método in vitro de análisis de ciprodinil en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- a. poner en contacto una muestra con un anticuerpo generado tal como se describe en esta solicitud de patente;
  - b. incubar la muestra y el anticuerpo del paso (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica;
- y

- c. determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación del paso (b).

El método de la presente invención permite la determinación cuantitativa o análisis cualitativo del contenido del fungicida ciprodinil en una muestra.

- 5 Según una realización preferida, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un antígeno de ensayo que es un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en esta solicitud de patente. Preferentemente, el inmunoensayo competitivo es de tipo ELISA.
- 10 Según otra realización preferida, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un antígeno de ensayo que es un compuesto de fórmula (III) tal como se describe en esta solicitud de patente. Preferentemente, el inmunoensayo competitivo es de tipo ELISA.
- 15 El término inmunoensayo hace referencia a un ensayo analítico en el que ocurre una reacción inmunoquímica para la detección o cuantificación de un analito. Los inmunoensayos competitivos son aquellos en los que el analito compite con el antígeno de ensayo por la unión con el anticuerpo.
- 20 El término antígeno en esta solicitud de patente se refiere a una molécula capaz de interactuar específicamente con un anticuerpo. La interacción o reacción inmunoquímica consiste en la unión específica y no covalente entre un anticuerpo y un antígeno, pudiendo ser éste el analito o un antígeno de ensayo. En la presente memoria el término antígeno de ensayo, antígeno enzimático o trazador se refiere a un compuesto de fórmula (I) acoplado a una molécula
- 25 portadora o marcadora que se utiliza en el ensayo competitivo.

Un sexto aspecto de la presente invención también se refiere a un kit de detección de ciprodinil que utiliza al menos un anticuerpo generado tal como se describe en esta solicitud de patente. Adicionalmente, el kit de detección de

ciprodinil puede comprender un antígeno de ensayo que es un compuesto de fórmula (II) o un compuesto de fórmula (III) tal como se describen en la presente solicitud de patente.

El compuesto de fórmula (II) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I) con **P**, un polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor a 2000 daltons, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

El procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (II) también puede comprender, de ser necesario, una etapa adicional de activación del grupo funcional **Y**.

Por otro lado, el compuesto de fórmula (III) de la presente invención se puede obtener por un procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (I) con **Q**, un marcador químico no isotópico, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

El procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (III) también puede comprender, de ser necesario, una etapa adicional de activación del grupo funcional **Y**.

Cuando el compuesto de fórmula (I) se caracteriza porque **Y** es un grupo carboxílico, la activación mencionada anteriormente puede tener lugar haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (I) con *N,N'*-disuccinimidilcarbonato. Este procedimiento de activación puede tener lugar en un disolvente orgánico como por ejemplo acetonitrilo, propanonitrilo, diclorometano, cloroformo, tetrahidrofurano, benceno o tolueno; en presencia de una base como por ejemplo trietilamina, triisopropilamina, piridina, 4-*N,N*-dimetilaminopiridina, picolina o diazo(1,3)biciclo-[5.4.0]undecano; en un intervalo de temperatura entre 0 y 30 °C.

Así mismo, la obtención de anticuerpos a partir de compuestos de fórmula (II) también puede tener lugar por métodos de inmunización ampliamente conocidos en la técnica.

Los términos inmunógeno e inmunogénico tal como se utilizan en la presente invención se refieren a una sustancia que es reconocida como extraña al organismo vivo y por lo tanto es capaz de producir o de generar una respuesta inmune en un huésped.

El término anticuerpo se refiere a una molécula que presenta afinidad de unión específica para el analito, excluyendo esencialmente otras sustancias no relacionadas. El término incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes y fragmentos de anticuerpo.

El término analito se refiere a una sustancia o grupo de sustancias cuya presencia o concentración se quiere determinar en la muestra. En el caso de la presente invención, el analito es el fungicida ciprodinil.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Para preparar anticuerpos frente a ciprodinil se requiere la preparación de derivados funcionalizados de dicho fungicida, es decir, análogos estructurales de ciprodinil que incorporan un grupo funcional susceptible de ser utilizado para la conjugación a un portador **P** o marcador **Q**. Este grupo funcional está separado del esqueleto de la molécula de ciprodinil por un espaciador **L**. La posición de incorporación del grupo funcional a la estructura de ciprodinil para la conjugación no es un aspecto obvio y puede ser determinante para la viabilidad de los inmunógenos como inductores de la producción de anticuerpos de afinidad y selectividad adecuadas frente a ciprodinil e incluso de

conjugados de ensayo que permitan el desarrollo de un inmunoensayo sensible y específico para dicho fungicida, objeto último de la presente invención.

A continuación se ilustra con algunos ejemplos y dibujos la forma en que puede efectuarse la preparación de varios derivados de ciprodinil que son compuestos de fórmula (I) y los correspondientes compuestos de fórmula (II) inmunogénicos, que no pretenden que sean limitativos de la presente invención, y que sirven para mostrar no solo la forma en que puede efectuarse la preparación de los mismos sino también la importancia que puede tener la naturaleza estructural del inmunógeno para la producción de anticuerpos de afinidad adecuada hacia el analito, aptos para el desarrollo de un buen inmunoensayo.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) CDm6.

Figura 2. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) CDp6.

15 Figura 3. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) CDb5.

Figura 4. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) CDn5.

Figura 5. Esquema de la preparación de un compuesto de fórmula (II) a partir del correspondiente compuesto de fórmula (I).

Figura 6. Señales obtenidas frente a 0.1µg de compuesto de fórmula (II) antigénico homólogo inmovilizado con los antisueros anti-ciprodinil a diluciones de  $1 \times 10^6$  (negro),  $3 \times 10^5$  (gris claro) y  $1 \times 10^5$  (gris oscuro).

Figura 7. Curvas estándar para ciprodinil en diferentes formatos de ELISA competitivo.

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (II) como inmunógenos para la obtención de anticuerpos anti-ciprodinil. En los siguientes ejemplos los números en negrita hacen referencia a la correspondiente estructura que se muestra en los esquemas de las Figuras 1 a 4. Estos ejemplos se presentan a modo de demostración pero de ningún modo pueden suponer un límite a la invención.

### 1. Preparación de compuestos de fórmula (II)

#### 1.1. Síntesis de compuestos de fórmula (I)

Ejemplo 1. Síntesis de CDm6 [radical del tipo T= R-I]

La síntesis del compuesto CDm6 (**5**) se describe en la Figura 1 e implica la elaboración del anillo de pirimidina a través de una reacción de condensación en medio básico de la 1-ciclopropilbutano-1,3-diona (**1**) con una aril-guanidina, tal como **3**, que incorpora la cadena hidrocarbonada de seis átomos de carbono que constituye el espaciador en la posición adecuada del anillo fenílico. Esta aril-guanidina se prepara previamente en forma de nitrato por reacción del éster metílico del ácido 6-(3-aminofenil)hexanoico (E. Moreauet al., *Bioorg. Med. Chem.* 2008, *16*, 1206–1217) con cianamida en medio etanólico ácido. La síntesis del compuesto CDm6 (**5**) se completa mediante una reacción de hidrólisis del éster metílico obtenido (**4**) en medio básico. A continuación se ilustran los detalles de la preparación y caracterización de este compuesto de fórmula (I) y los intermedios de su síntesis.

i) *Preparación del nitrato de 6-(3-guanidinofenil)hexanoato de metilo(3).*

Una mezcla de 6-(3-aminofenil)hexanoato de metilo (**2**, 188 mg, 0.850 mmol), disolución acuosa de cianamida al 50% (132  $\mu$ L, 1.70 mmol, 2 equiv.) y HNO<sub>3</sub> concentrado (70% p/v, 84  $\mu$ L, 1.13 mmol, 1.3 equiv.) en EtOH (1.6 mL)



se introdujo en una ampolla topacio bajo nitrógeno. La ampolla se cerró a vacío y se calentó con agitación a 78 °C durante toda la noche. El contenido de la ampolla se transfirió a un matraz con la ayuda de EtOH, se concentró a sequedad bajo vacío y el residuo se purificó por cromatografía, usando CHCl<sub>3</sub>-  
5 MeOH 9:1 como eluyente, para dar el nitrato de la arilguanidina **3** (242 mg, 87%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.62 (1H, s, NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>), 7.92 (2H, s ancho, NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>), 6.60 (1H, s ancho, NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>), 7.33 (1H, dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, H-5 Ph), 7.14 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-4 Ph), 7.07 (2H, m, H-2 y H-6 Ph), 3.64 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me), 2.62 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-6), 2.30 (2H, t, *J* =  
10 7.4 Hz, H-2), 1.64 (4H, m, H-3 y H-5), 1.35 (2H, m, H-4); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 174.3 (CO<sub>2</sub>Me), 156.4 (NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>), 145.1 (C-3 Ph), 134.0 (C-1 Ph), 130.0 (C-5 Ph), 128.0 (C-4 Ph), 125.2 (C-6 Ph), 122.5 (C-2 Ph), 51.5 (CO<sub>2</sub>Me), 35.3 (C-6), 33.8 (C-2), 30.6 (C-3), 28.5 (C-5), 24.5 (C-4); IR (NaCl)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3338, 3200, 2940, 1724, 1674, 1600, 1352, 1267, 736; EM (IE) *m/z* (%) 263 (M<sup>+</sup>, 100), 262 (13), 246 (4), 233 (3), 232 (18), 221 (17), 190 (5), 170 (12), 148 (8), 132 (38); EMAR *m/z* calculado para C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 263.16338, encontrado 263.16271.

ii) *Preparación del 6-(3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenil)-hexanoato de metilo (4).*

20 Una mezcla del nitrato de arilguanidina **3** (143.1 mg, 0.438 mmol), 1-ciclopropilbutano-1,3-diona (**1**, 110.5 mg, 0.876 mmol, 3 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (23.2 mg, 0.219 mmol, 0.5 equiv.) y MeOH (1 mL) contenida en una ampolla de vidrio cerrada a vacío se calentó con agitación a 78°C durante 48 h. La ampolla se abrió y el disolvente se evaporó a presión reducida para dar un residuo que fue  
25 purificado por cromatografía de columna, usando CHCl<sub>3</sub> como eluyente, para obtener el derivado pirimidínico **4** (96.5 mg, 62%) como un aceite. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.50 (1H, dd, *J* = 1.6, 1.6 Hz, H-2 Ph), 7.39 (1H, ddd, *J* = 7.7, 1.8, 1.6 Hz, H-4 Ph), 7.19 (1H, dd, *J* = 7.7, 7.7 Hz, H-5 Ph), 6.96 (1H, s ancho, H-NH), 6.80 (1H, ddd, *J* = 7.7, 1.6, 1.6 Hz, H-6 Ph), 6.51 (1H, s, H-5 Pirim), 3.66 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me), 2.60 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-6), 2.34 (3H, s, Me), 2.31  
30

(2H, t,  $J = 7.7$  Hz, H-2), 1.85 (1H, m, CH-ciclopropilo), 1.67 (4H, m, H-3 yH-5), 1.39 (2H, m, H-4), 1.15 y 0.99 (2H cada uno m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 174.2 (CO<sub>2</sub>Me), 172.4 (C-2 Pirim), 166.6 (C-6 Pirim), 159.8 (C-4 Pirim), 143.1 (C-3 Ph), 140.1 (C-1 Ph), 128.6 (C-5 Ph), 121.9 (C-4 Ph), 118.6 (C-6 Ph), 116.0 (C-2 Ph), 110.0 (C-5 Pirim), 51.4 (CO<sub>2</sub>Me), 35.9 (C-6), 34.0 (C-2), 31.0 (C-3), 28.7 (C-5), 24.8 (C-4), 23.8 (Me), 16.8 (CH-ciclopropilo), 10.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (NaCl)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3356, 3009, 2932, 2850, 1736, 1588, 1541, 1445, 1171, 789, 695; EM (IE) $m/z$  (%) 353 (M<sup>+</sup>, 97), 352 (28), 323 (49), 322 (15), 294 (12), 280 (17), 266 (11), 252 (51), 250 (87), 240 (17), 239 (100), 238 (23), 221 (20); EMAR  $m/z$  calculado para C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 353.21033, encontrado 353.21022.

iii) *Preparación del ácido 6-(3-((4-ciclopropil-6-metilpyrimidin-2-il)amino)fenil)hexanoico (5, compuesto CDm6).*

Una mezcla del éster metílico **4** (82.3 mg, 0.233 mmol) en una mezcla de MeOH (2 mL) y una disolución acuosa 2M de NaOH (0.47 mL, 0.932 mmol, 4 equiv.) se calentó a reflujo con agitación durante 2 h. Después de eliminar el disolvente a presión reducida, el residuo sólido obtenido se disolvió en la mínima cantidad de ácido fórmico y la disolución resultante se agitó a la vez que se añadía agua, gota a gota, hasta la aparición de un sólido blanco. La suspensión blanquecina se dejó enfriando en la nevera durante varias horas y se filtró. Los cristales se lavaron con agua fría y se secaron durante toda la noche en un desecador a vacío, para obtener el compuesto CDm6 (**5**, 57.7 mg, 73%) como un sólido, prácticamente puro por análisis de <sup>1</sup>H RMN. Pf. 170–173 °C (cristalizado de DMSO–H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 11.98 (1H, s ancho, CO<sub>2</sub>H), 9.26 (1H, s, NH), 7.69 (1H, s ancho, H-2 Ph), 7.45 (1H, d ancho,  $J = 8.0$  Hz, H-4 Ph), 7.11 (1H, dd,  $J = 7.7, 7.7$  Hz, H-5 Ph), 6.71 (1H, d ancho,  $J = 7.7$  Hz, H-6 Ph), 6.66 (1H, s, H-5 Pirim), 2.28 (3H, s, Me), 2.56 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 2.20 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-2), 1.94 (1H, m, CH-ciclopropilo), 1.56 (4H, m, H-3 yH-5), 1.31 (2H, m, H-4), 1.01 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 174.4 (CO<sub>2</sub>H), 171.4 (C-2 Pirim), 166.2

(C-6 Pirim), 159.8 (C-4 Pirim), 142.1 (C-3 Ph), 140.8 (C-1 Ph), 128.1 (C-5 Ph), 120.9 (C-4 Ph), 118.2 (C-6 Ph), 115.8 (C-2 Ph), 109.4 (C-5 Pirim), 35.3 (C-6), 33.5 (C-2), 30.5 (C-5), 28.2 (C-4), 24.3 (C-3), 23.3 (Me), 16.2 (CH-ciclopropilo), 9.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3292, 3213, 3101, 3014, 2932, 2853, 1700, 1633, 1604, 1558, 1487, 1452, 1404, 1264, 960, 784; EMAR (TOF EM ES+)  $m/z$  calculado para C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na[M+Na]<sup>+</sup> 362.18445, encontrado 362.18380.

### Ejemplo 2. Síntesis de CDp6 (**9**) [radical del tipo T= R-I]

La síntesis del compuesto CDp6 (**9**) se describe en la Figura 2. Su síntesis parte de la 1-ciclopropilbutano-1,3-diona (**1**) e implica una secuencia de transformaciones idéntica a la descrita en el ejemplo 1 para la preparación del compuesto CDm6 (**5**), pero utilizando en este caso la aril-guanidina **7**, preparada a partir de la reacción del éster metílico del ácido 6-(4-aminofenil)hexanóico (**6**) (C. Suárez-Pantaleón et al., *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 11122–11131) con cianamida en medio etanólico ácido.

A continuación se ilustran los detalles de la preparación y caracterización de este compuesto de fórmula (I) y los intermedios de su síntesis.

#### *i) Preparación del nitrato de 6-(4-guanidinofenil)hexanoato de metilo (7)*

Una mezcla de 6-(4-aminofenil)hexanoato de metilo (**6**, 115 mg, 0.515 mmol), disolución acuosa al 50% de cianamida (75  $\mu\text{L}$ , 0.780 mmol, 1.5 equiv.) y HNO<sub>3</sub> concentrado (70% p/v, 40  $\mu\text{L}$ , 0.517 mmol, 1 equiv.) en EtOH (1 mL) se calentó en una ampolla cerrada con agitación a 78 °C por 22 h. El contenido de la ampolla se concentró a vacío y el aceite anaranjado obtenido se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice, usando CHCl<sub>3</sub>-MeOH 9:1 como eluyente, para obtener la aril-guanidina **7** (134.5 mg, 79%), en forma de nitrato, como un sólido blanco. Pf 119–121 °C (cristalizado de CHCl<sub>3</sub>-EtOAc); RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 9.54 (1H, s, NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>), 7.80 (3H, sa, NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>), 7.20 (2H, aparente d, parte AA' de un sistema AA'BB',  $J = 8.1$  Hz, H-2/H-6 Ph), 7.13 (2H, aparente d, parte BB' de un sistema AA'BB',  $J = 8.1$

Hz, H-3/H-5 Ph), 3.64 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me), 2.60 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 2.28 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-2), 1.61 (4H, m, H-3 y H-5), 1.34 (2H, m, H-4); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 174.1 (CO<sub>2</sub>Me), 156.6 (NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>), 142.7 (C-1 Ph), 131.6 (C-4 Ph), 130.1 (C-2/C-6 Ph), 125.5 (C-3/C-5 Ph), 51.5 (CO<sub>2</sub>Me), 35.1 (C-6), 33.8 (C-2), 30.8 (C-3), 28.5 (C-5), 24.6 (C-4); EM (IE) $m/z$  (%) 263(M<sup>+</sup>, 8), 247 (1), 246 (7), 221 (10), 170 (25), 148 (15), 132 (10), 131 (59), 106 (26), 106 (100); EMAR  $m/z$  calculado para C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 263.16338, encontrado 263.16446.

ii) Preparación del 6-(4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenil) hexanoato de metilo (**8**)

Una mezcla de la arilguanidina **7** (116 mg, 0.355 mmol), 1-ciclopropilbutano-1,3-diona (**1**, 134.5 mg, 1.066 mmol, 3 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (18.8 mg, 0.177 mmol, 0.5 equiv.) y MeOH (1 mL) contenida en una ampolla cerrada a vacío se calentó con agitación a 78 °C durante 50 h. El contenido de la ampolla se concentró a presión reducida y se cromatografió en gel de sílice, usando CHCl<sub>3</sub> como eluyente, para obtener el derivado pirimidílico **8** (95 mg, 76%) como un aceite viscoso. RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.51 (2H, aparente d, parte AA' de un sistema AA'BB',  $J = 8.4$  Hz, H-3/H-5 Ph), 7.09 (2H, aparente d, parte BB' de un sistema AA'BB',  $J = 8.4$  Hz, H-2/H-6 Ph), 6.94 (1H, sa, H-NH), 6.48 (1H, s, H-5 Pirim), 3.66 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me), 2.56 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 2.30 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 1.84 (1H, m, CH-ciclopropilo), 1.62 (4H, m, H-3 y H-5), 1.36 (2H, m, H-4), 1.13 y 0.98 (2H cada uno, cada uno m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 174.2 (CO<sub>2</sub>Me), 172.4 (C-2 Pirim), 166.5 (C-6 Pirim), 159.9 (C-4 Pirim), 137.8 (C-1 Ph), 135.8 (C-4 Ph), 128.6 (C-2/C-6 Ph), 118.6 (C-3/C-5 Ph), 109.7 (C-5 Pirim), 51.4 (CO<sub>2</sub>Me), 35.0 (C-6), 34.0 (C-2), 31.1 (C-3), 28.7 (C-5), 24.8 (C-4), 23.8 (Me), 16.8 (CH-ciclopropilo), 10.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (KBr)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3361, 3273, 3192, 3008, 2930, 2855, 1736, 1595, 1530, 1463, 1405, 1364, 1290, 1248, 959, 818, 757; EM (IE) $m/z$  (%) 353 (M<sup>+</sup>, 81), 352 (12), 323 (2), 322 (7), 252 (5), 239 (21), 238 (100), 221

(6), 187 (6), 106 (58); EMAR  $m/z$  calculado para  $C_{21}H_{27}N_3O_2$  353.21033, encontrado 353.21057.

iii) Preparación del ácido 6-(4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenil)hexanoico (**9**, compuesto CDp6)

5 Una disolución del éster metílico **8** (128.5 mg, 0.364 mmol) en una mezcla de MeOH (4 mL) y NaOH acuoso 2M (0.73 mL, 1.46 mmol, 4 equiv.) se agitó a 60 °C durante 2.5 h. La mezcla de reacción amarillenta formada se transfirió a un matraz y la mayoría del disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo pardusco semisólido obtenido se disolvió en ácido fórmico (aproximadamente  
10 0.5 mL), se diluyó con agua y se extrajo con  $CHCl_3$ . Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con disolución saturada de NaCl y se secaron sobre  $MgSO_4$  anhidro. La filtración y evaporación del disolvente a vacío proporcionó el compuesto CDp6 (**9**, 104.5 mg, 85%) como un sólido blanco y que por análisis de RMN de  $^1H$  y cromatografía de capa fina mostró ser prácticamente  
15 puro. Pf 146–147 °C (cristalizado de MeOH);  $^1H$  RMN de (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 11.97 (1H, s, COOH), 9.22 (1H, s, NH), 7.62 (2H, aparente d, parte AA' de un sistema AA'BB',  $J = 8.5$  Hz, H-3/H-5 Ph), 7.04 (2H, aparente d, parte BB' de un sistema AA'BB',  $J = 8.5$  Hz, H-2/H-6 Ph), 6.62 (1H, s, H-5 Pirim), 2.48 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 2.19 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 1.92 (1H, m, CH-ciclopropilo), 1.52 (4H, m, H-3 y H-5), 1.27 (2H, m, H-4), 0.99 (4H, m,  $CH_2CH_2$ -ciclopropilo);  $^{13}C$  RMN de (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 174.4 ( $CO_2Me$ ), 171.4 (C-2 Pirim), 166.1 (C-6 Pirim), 159.8 (C-4 Pirim), 138.6 (C-1 Ph), 134.4 (C-4 Ph), 128.0 (C-2/C-6 Ph), 118.4 (C-3/C-5 Ph), 109.0 (C-5 Pirim), 34.3 (C-6), 33.5 (C-2), 30.8 (C-5), 28.1 (C-4), 24.3 (C-3), 23.3 (Me), 16.3 (CH-ciclopropilo), 9.8  
20 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (KBr)  $\nu_{max}/cm^{-1}$  3306, 3209, 3006, 2968, 2928, 2848, 1684, 1592, 1559, 1517, 1406, 964, 807; EM (IE)  $m/z$  (%) 339 ( $M^+$ , 75), 338 (12), 252 (6), 250 (2), 240 (2), 239 (20), 238 (100), 237 (2), 236 (2), 224 (2), 222 (2), 131 (4); EMAR  $m/z$  calculado para  $C_{20}H_{25}N_3O_2$  339.19468, encontrado 339.19430.  
25

Ejemplo 3. Síntesis de CDb5 (**18**) [radical del tipo T= R-IV]

La síntesis del compuesto de fórmula (I) que incorpora el espaciador por el anillo de pirimidina se basa en la preparación previa de un compuesto 1,3-dicarbonílico que incorpora en la posición adecuada la cadena hidrocarbonada carboxilada que constituye el espaciador del compuesto de fórmula (I) en cuestión. Una vez preparado este intermedio se completa la elaboración del anillo de pirimidina a través de una reacción de condensación de los grupos carbonilo con los grupos amino de la fenilguanidina. Tal como se ilustra en la Figura 3, la preparación del compuesto 1,3-dicarbonílico (**15**) se lleva a cabo a través de la reacción de acilación del 3-ciclopropil-3-oxopropanoato de alilo (**12**), obtenido vía condensación de Claisen de la ciclopropilmetilcetona (**10**) con carbonato de dialilo (**11**) en medio básico, con el 6-cloro-6-oxohexanoato de metilo (**13**), seguido de reacción de desalilación-descarboxilativa catalizada por Pd(0). La condensación de la 1,3-dicetona (**15**), que existe en un equilibrio tautomérico en el que básicamente predomina la forma enólica, con el nitrato de la fenilguanidina (**16**) en medio básico genera el esqueleto completo del hapteno cuya síntesis finaliza con la hidrólisis del éster metílico de (**17**) en medio básico acuoso. A continuación se ilustran los detalles de la preparación y caracterización de este compuesto (**18**) y todos los intermedios de su síntesis.

i) Preparación del 3-ciclopropil-3-oxopropanoato de alilo (**12**)

Carbonato de dialilo (**11**, 1.0 g, 2.55 mL, 17.82 mmol, 1.5 equiv.) y 1-ciclopropilmetanona (**10**, 1.17 mL, 11.88 mmol, 1 equiv.) se añadieron sucesivamente a una suspensión agitada de HNa (dispersión al 60% en aceite mineral, 1.19 g, 29.75 mmol, 2.5 equiv.) en benceno anhidro (5 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno y la mezcla se refluyó durante 5 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se trató cuidadosamente con disolución acuosa de HCl 3 M hasta pH ácido y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, usando hexano–Et<sub>2</sub>O 9:1 como eluyente,

para proporcionar el  $\beta$ -cetoéster **12** (1.36 g, 60%) como un aceite. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.88 (1H, ddt,  $J = 17.2, 10.4, 5.7$  Hz, H-2 alilo), 5.32 (1H, ddt,  $J = 17.2, 1.5, 1.5$  Hz, H-3 alilo), 5.23 (1H, ddt,  $J = 10.4, 1.5, 1.4$  Hz, H'-3 alilo), 4.62 (2H, dt,  $J = 5.7, 1.4$  Hz, H-1 alilo), 3.58 (2H, s, H-2), 2.02 (1H, tt,  $J = 4.5, 4.4$  Hz, CH-ciclopropilo), 1.09 y 0.95 (2H cada uno, cada uno m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -ciclopropilo); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 202.4 (C-1), 166.6 (C-3), 131.5 (C-2 alilo), 118.4 (C-3 alilo), 65.6 (C-1 alilo), 49.6 (C-2), 20.6 (CH-ciclopropilo), 11.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -ciclopropilo); IR (NaCl)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3088, 3012, 2943, 1736, 1707, 1649, 1442, 1385, 1312, 1271, 1151, 1074, 992, 933, 735.

10 ii) *Preparación del (E)-2-(ciclopropanocarbonil)-3-hidroxi-oct-2-enodioato de 1-alil-8-metilo (14)*

El  $\beta$ -cetoéster **12** (288.3 mg, 1.5 mmol) se añadió sobre una suspensión agitada de  $\text{MgCl}_2$  (142.8 mg, 1.5 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (2 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se añadió piridina seca (243  $\mu\text{L}$ , 3 mmol) y la mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 15 min. A continuación se añadió cloruro de adipoilo (**13**, 234  $\mu\text{L}$ , 1.5 mmol) y se agitó a 0 °C durante 15 min y luego a temperatura ambiente durante 1 h. Después de adicionar HCl 6 M (3 mL) a la suspensión blanquecina formada, la mezcla se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$ , los extractos orgánicos se lavaron con disolución saturada de NaCl y se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La purificación cromatográfica del residuo obtenido, utilizando hexano-EtOAc 9:1 como eluyente, proporcionó un aceite amarillento correspondiente a la  $\beta$ -dicetona esperada, la cual existe exclusivamente en la forma tautomérica ceto-enólica **14** (457.5 mg, 98%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.98 (1H, ddt,  $J = 17.2, 10.4, 5.9$  Hz, H-2 alilo), 5.32 (1H, ddt,  $J = 17.2, 1.5, 1.5$  Hz, H-3 alilo), 5.23 (1H, ddt,  $J = 10.4, 1.3, 1.3$  Hz, H'-3 alilo), 4.72 (2H, dt,  $J = 5.9, 1.3$  Hz, H-1 alilo), 2.60 (2H, m, H-7), 2.31 (3H, m, H-4yCH-ciclopropilo), 1.66 (4H, m, H-5yH-6), 1.22 y 0.99 (2H cada uno, cada uno m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -ciclopropilo). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 199.2 (CO-ciclopropilo), 195.0 (C-3), 173.8 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 167.4 (C-1), 131.7 (C-2 alilo), 119.1 (C-3 alilo), 108.6 (C-2), 65.7 (C-1 alilo), 51.5

(CO<sub>2</sub>Me), 36.6 (C-4), 33.7 (C-7), 25.4 (C-6), 24.5 (C-5), 16.6 (CH-ciclopropilo), 12.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (NaCl)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3087, 3014, 2952, 2873, 1735, 1560, 1437, 1271, 1208, 1101, 1062, 936, 737; EM (IE)  $m/z(\%)$  310 (M<sup>+</sup>, 0.7), 282 (0.6), 252 (1), 253 (0.5), 251 (0.4), 226 (2.5), 220 (0.4), 195 (4), 143 (6.4),  
5 126 (10), 111 (30), 69 (100); EMAR  $m/z$  calculado para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub> 310.14164, encontrado 310.14148.

*iii) Preparación de (Z)-8-ciclopropil-6-hidroxi-8-oxooct-6-enoato de metilo (15)*

Sobre una disolución del éster alílico **14** (431 mg, 1.388 mmol) en THF (5.8 mL) se añadieron Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (105.6 mg, 0.091 mmol, 0.06 equiv.) y morfolina  
10 (254  $\mu\text{L}$ , 2.916 mmol, 2 equiv.) gota a gota. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó a esta temperatura durante 40 min. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, usando hexano–Et<sub>2</sub>O 9:1 como eluyente, para dar el ceto-enol **15** (285.8 mg, 91%), que existe en equilibrio con  
15 la forma tautomérica 6,8-dicetónica [aproximadamente una mezcla 4:1 de la forma ceto-enol **15** y el tautómero 6,8-dicetónico]. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 15.63 (0.8H, s, OH, forma ceto-enol), 5.60 (0.8H, s, H-7 forma ceto-enol), 3.67 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me formas ceto-enol + diceto), 3.66 (0.4H, s, H-7 forma diceto), 2.51 (0.4H, m, H-5 forma ceto), 2.34 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-2 formas ceto-enol +  
20 diceto), 2.26 (1.6H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-5 forma ceto-enol), 2.0 (0.2H, m, CH-ciclopropilo forma diceto), 1.55–1.51 (4.8H, m, H-3 y H-4 formas ceto-enol + diceto y CH-ciclopropilo forma ceto-enol), 1.09 y 0.92 (2H cada uno, cada uno m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo formas ceto-enol + diceto); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (*solo se dan las señales del tautómero ceto-enol mayoritario 15*)  $\delta$  (ppm) 199.0 (C-8),  
25 187.3 (C-6), 173.7 (CO<sub>2</sub>Me), 98.8 (C-7), 51.5 (CO<sub>2</sub>Me) 36.3 (C-5), 33.6 (C-2), 25.3 (C-3), 24.3 (C-4), 18.5 (CH-ciclopropilo), 10.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (NaCl)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3008, 2945, 2863, 1735, 1609, 1440, 1377, 932, 777.

*iv) Preparación de 5-(6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-il)pentanoato de metilo (17)*



Una mezcla del nitrato de la fenilguanidina **16** (289.1 mg, 1.459 mmol, 1.6 equiv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (76.3 mg, 0.72 mmol, 0.8 equiv.) y el ceto-enol **15** (203.6 mg, 0.90 mmol) en MeOH (2.5 mL) se calentó a 80 °C con agitación en una ampolla cerrada durante 24 h. La mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con disolución acuosa saturada de NaCl, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron para dar un residuo aceitoso que se purificó cromatográficamente sobre gel de sílice, usando hexano–EtOAc 9:1 como eluyente, proporcionando el derivado pirimidínico **17** (231.3 mg, 79%) como un aceite. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.62 (2H, aparente dd, parte AA' de un sistema AA'BB'C, J = 7.5, 0.9 Hz, H-2/H-6 Ph), 7.30 (2H, aparente t, parte BB' de un sistema AA'BB'C, J = 7.5 Hz, H-3/H-5 Ph), 7.01 (1H, sa, NH), 6.97 (1H, aparente tt, parte C de un sistema AA'BB'C, J = 7.5, 0.9 Hz, H-4 Ph), 6.49 (1H, s, H-5 Pirim), 3.67 (3H, s, CO<sub>2</sub>Me), 2.59 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-5), 2.36 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-2), 1.86 (1H, m, CH-ciclopropilo), 1.72 (4H, m, H-3 y H-4), 1.15 y 0.98 (2H cada uno, cada uno m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 173.9 (CO<sub>2</sub>Me), 172.5 (C-4 Pirim), 169.8 (C-2 Pirim), 159.8 (C-6 Pirim), 140.1 (C-1 Ph), 128.7 (C-3/C-5 Ph), 121.6 (C-4 Ph), 118.4 (C-2/C-6 Ph), 109.5 (C-5 Pirim), 51.5 (CO<sub>2</sub>Me), 37.1 (C-5), 33.8 (C-2), 27.9 (C-4), 24.5 (C-3), 16.8 (CH-ciclopropilo), 10.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (NaCl) ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup> 3356, 3002, 2939, 2856, 1730, 1584, 1443, 1249, 1026, 754; EM (IE) m/z(%) 325 (M<sup>+</sup>, 17), 324 (4), 295 (2), 294 (8), 266 (4), 252 (13), 226 (16), 225 (100), 224 (11), 178 (3); EMAR m/z calculado para C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 325.17903, encontrado 325.17933.

v) Preparación del ácido 5-(6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-il) pentanoico (**18**, compuesto de fórmula (I) CDb5)

Una disolución del éster metílico **17** (159 mg, 0.488 mmol) en una mezcla de MeOH (5.3 mL) y disolución acuosa de NaOH 2 M (0.98 mL, 1.96 mmol, 4 equiv.) se agitó a 60 °C durante 1.5 h. La mayor parte del disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en la mínima cantidad de ácido fórmico y la disolución resultante se concentró de nuevo a vacío. El

residuo sólido blanco obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, usando  $\text{CHCl}_3$ -EtOAc 9:1 como eluyente, para dar el compuesto CDb5 (**18**, 129.3 mg, 85%) como un sólido blanco, prácticamente puro por análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y cromatografía de capa fina. Pf 158–160 °C (cristalizado de benceno); RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 12.02 (1H, s, COOH), 9.32 (1H, s, NH), 7.74 (2H, aparente dd, parte AA' de un sistema AA'BB'C,  $J = 7.7, 0.9$  Hz, H-2/H-6 Ph), 7.23 (2H, aparente t, parte BB' de un sistema AA'BB'C,  $J = 7.7$  Hz, H-3/H-5 Ph), 6.88 (1H, aparente tt, parte C de un sistema AA'BB'C,  $J = 7.3, 0.9$  Hz, H-4 Ph), 6.67 (1H, s, H-5 Pirim), 2.54 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-5), 2.25 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-2), 1.95 (1H, m, CH-ciclopropilo), 1.67 (2H, m, H-4), 1.54 (2H, m, H-3), 1.03-0.97 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -ciclopropilo); RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 174.3 (CO<sub>2</sub>H), 171.6 (C-4 Pirim), 169.7 (C-2 Pirim), 159.8 (C-6 Pirim), 140.9 (C-1 Ph), 128.3 (C-3/C-5 Ph), 120.7 (C-4 Ph), 118.3 (C-2/C-6 Ph), 108.8 (C-5 Pirim), 36.4 (C-5), 33.4 (C-2), 27.5 (C-4), 24.1 (C-3), 16.4 (CH-ciclopropilo), 9.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3290, 3138, 2936, 2360, 1684, 1590, 1558, 1499, 1386, 1250, 970, 756, 689; EM (IE)  $m/z(\%)$  311 ( $\text{M}^+$ , 24), 310(4), 309 (2), 266 (4), 265 (6), 264 (14), 250 (4), 238 (11), 226 (14), 224 (16), 225 (100), 210 (4.5); EMAR  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$  311.16338, encontrado 311.16254.

#### 20 Ejemplo 4. Síntesis de CDn5 (**21**) [radical del tipo **T= R-V**]

La síntesis del compuesto de fórmula (I) que incorpora el espaciador por el nitrógeno amínico de ciprodinil se lleva a cabo a través de una reacción de alquilación del anión amiduro derivado del mismo con el  $\omega$ -bromo éster de longitud de cadena adecuada, seguido de hidrólisis básica del grupo éster al correspondiente ácido carboxílico, tal como se ilustra en la Figura 4 y se detalla a continuación.

*i) Preparación del 5-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il) (fenil)amino)pentanoato de metilo (**20**)*

Una disolución de ciprodinil (170 mg, 0,754 mmol) en DMF anhidra (3 mL) se añadió gota a gota sobre una disolución agitada de NaOH (60% dispersión en aceite mineral, 36.9 mg, 0.925 mmol, 1.2 equiv., prelavado con pentano seco) en DMF (2 mL) a 0 °C bajo nitrógeno. Después de 30 min de agitación a esta temperatura la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 15 min adicionales. A continuación se añadió 5-bromoisovalerato de metilo (**19**, 0.224 mL, 1.51 mmol, 2 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 h. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con disoluciones acuosas saturadas de LiCl y Na, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron a vacío. El residuo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice, usando hexano–EtOAc 9:1 como eluyente, obteniéndose una mezcla aproximadamente 7:3 (basado en el análisis de RMN de <sup>1</sup>H) del éster y el material de partida no reaccionado que no pudo separarse por las técnicas cromatográficas convencionales (203.4 mg).

*ii) Preparación del ácido 5-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino)pentanoico (**21**, compuesto de fórmula (I) CDn5)*

Se añadió LiOH·H<sub>2</sub>O (158.4 mg, 3.80 mmol) a una disolución de la mezcla previamente obtenida (200 mg, ca. 0.41 mmol de **20**) en THF (3.3 mL) y agua (1.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y el THF se eliminó a presión reducida en un rotavapor. El residuo obtenido se diluyó con agua (4 mL), se acidificó por la adición de KHSO<sub>4</sub> sólido hasta pH 3–4 y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron para obtener un residuo que se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, usando CHCl<sub>3</sub>–MeOH 9:1 como eluyente, para proporcionar, en orden de elución, ciprodinil de partida no reaccionado (53 mg) y el compuesto deseado CDn5 (**21**, 132.6 mg, 54% a partir de ciprodinil) como un sólido. Pf 118–121 °C (cristalizado de hexano–benceno). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.0 (1H, sa, COOH),

7.37-7.17 (5H, m, Ph), 6.37 (1H, s, H-5 Pirim), 3.99 (2H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-5), 2.37 (2H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-2), 1.67 (4H, m, H-3 y H-4), 1.75 (1H, m, CH-ciclopropilo), 0.96 y 0.87 (2H cada uno, cada uno m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 179.2 (C-1), 171.4 (C-2 Pirim), 166.2 (C-4 Pirim), 161.6 (C-6 Pirim), 144.6 (C-1 Ph), 128.6 (C-3/C-5 Ph), 127.4 (C-2/C-6 Ph), 125.1 (C-4 Ph), 108.5 (C-5 Pirim), 49.6 (C-5), 33.7 (C-2), 27.4 (C-4), 23.9 (Me), 21.9 (C-3), 16.5 (CH-ciclopropilo), 9.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-ciclopropilo); IR (KBr)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3400–2600, 3009, 2940, 2861, 1698, 1574, 1558, 1473, 1398, 1307, 1236, 1100, 959, 819, 702; EM (IE) $m/z$  (%) 325 (M<sup>+</sup>, 25), 324 (11), 310 (2), 253 (6), 252 (33), 250 (2.5), 239 (19), 238 (100), 225 (19), 224 (21), 222 (3), 210 (2), 163 (6); EMAR  $m/z$  calculado para C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 325.17903, encontrado 325.17857.

## 1.2. Activación de los compuestos de fórmula (I)

Los ejemplos de compuestos de fórmula (I) aquí presentados contienen un grupo carboxilo como grupo químico funcional para su conjugación a proteínas portadoras, concretamente por reacción con los grupos amino libres de la proteína. El grupo carboxilo se activó según el esquema de la Figura 5, utilizando carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo(DSC) siguiendo protocolos previamente publicados [F.A. Esteve-Turrillas et al., *Anal. Chim. Acta*2010, 682, 93–103]. En concreto, se disolvió 0.082 mmol del correspondiente compuesto de fórmula (I) de ciprodinil y 0.14 mmol de DSC en 0.8 mL de acetonitrilo seco en atmósfera de nitrógeno. A continuación, se añadió 0.31 mmol de trietilamina y se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición del material de partida (análisis por cromatografía de capa fina). La disolución se diluyó en cloroformo, se lavó con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Después de evaporar el disolvente, el residuo restante se purificó por cromatografía en columna, usando cloroformo como eluyente, obteniéndose el éster de *N*-hidroxisuccinimida del compuesto de fórmula (I) de ciprodinil en forma pura.

### 1.3. Conjugación de los compuestos de fórmula (I) a proteínas para obtener compuestos de fórmula (II)

Tampones y disoluciones:

PB: Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4;

5 PBS: Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4 con NaCl 140 mM;

PBST: Tampón PBS conteniendo 0.05% (v/v) de polioxietileno (20) sorbitanmonolaurato (conocido como Tween 20);

CB: Tampón carbonato sódico 50 mM, pH 9.6;

Disolución de lavado: NaCl 150 mM conteniendo 0.05% (v/v) de Tween 20.

10 Los analitos se disolvieron en *N,N*-dimetilformamida (DMF) anhidra y se almacenaron a -20 °C.

Los compuestos de fórmula (II) se prepararon como se esquematiza en la Figura 5, según los procedimientos siguientes.

#### 1.3.1. Inmunógeno

15 A 2.0 mL de una disolución de 15 mg/mL de proteína albúmina de suero bovino (BSA) en tampón CB se añadió gota a gota 200 µL de una disolución 50 mM de compuesto de fórmula (I) activado, obtenido tal como se indica en el apartado 1.2, en DMF. La reacción se llevó a cabo durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave y a continuación, el conjugado se purificó por  
20 cromatografía de exclusión molecular usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación, *n* tal como se describe en el compuesto de fórmula (II), medido espectrofotométricamente fue de 11, 11, 14 y 14 para CDm6, CDp6, CDb5 y CDn5, respectivamente.

#### 1.3.2. Compuesto de fórmula (II) como antígeno de ensayo

25 A 2.0 mL de una disolución de 15 mg/mL de proteína albúmina de huevo (OVA) en tampón CB se añadió gota a gota 100 µL de una disolución 100 mM de compuesto de fórmula (I) activado, obtenido tal como se indica en el apartado 1.2, en DMF. La reacción se llevó a cabo durante 2.5 h a temperatura

ambiente con agitación suave y a continuación, el compuesto de fórmula (II) se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación, *n* tal como se describe en el compuesto de fórmula (II), medido espectrofotométricamente fue de 8, 8, 8 y 9 para CDm6, CDp6, CDb5 y CDn5, respectivamente.

### 1.3.3. Trazador o antígeno enzimático

A 1.0 mL de una disolución de 2.2 mg/mL de proteína peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón CB se añadió gota a gota 100  $\mu$ L de una disolución 10 mM (ó 5 mM) de compuesto de fórmula (I) activado, obtenido tal como se indica en el apartado 1.2, en DMF. La reacción se llevó a cabo durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave y a continuación, el conjugado se purificó por cromatografía de exclusión molecular usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación, *n* tal como se describe en el compuesto de fórmula (II), medido espectrofotométricamente fue de 4, 6, 5 y 3 para CDm6, CDp6, CDb5 y CDn5, respectivamente.

## 2. Inmunización de conejos

Se inmunizaron, siguiendo protocolos estandarizados, 2 hembras de conejo blancas de la raza New Zealand con cada inmunógeno que son compuestos de fórmula (II) donde **P** es BSA obtenidos tal como se describe en el apartado 1.3.1. [C. Suárez-Pantaleón et al., *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 8502–8511]. Cada animal recibió 0.3 mg de uno de los inmunógenos disuelto en 1 mL de una mezcla 1:1 de tampón PB y adyuvante de Freund completo. La inmunización prosiguió con la inoculación de una dosis de recuerdo cada 21 días con la misma cantidad de inmunógeno pero empleando adyuvante de Freund incompleto. Diez días después de la cuarta inyección, los animales fueron desangrados y la sangre obtenida se dejó coagular a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperaron los sueros por centrifugación, se diluyeron a ½ con PBS frío y se les añadió un volumen de una disolución saturada de sulfato amónico. El precipitado proteico resultante de cada suero

se recogió por centrifugación y se redisolvió en tampón PBS frío. Finalmente, las proteínas se reprecipitaron como anteriormente y se almacenaron en este estado a 4°C. Este precipitado contiene una mezcla indeterminada de proteínas que denominamos antisuero, anticuerpo policlonal o simplemente anticuerpo.

5 Se obtuvieron dos antisueros de cada inmunógeno, identificados como #1 y #2.

### 3. Procedimiento ELISA

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada antisuero se evaluó en los dos formatos clásicos de ELISA competitivo (el de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta y el de anticuerpo inmovilizado con detección directa) usando tanto antígenos de ensayo homólogos, es decir un antígeno de ensayo a partir del mismo compuesto de fórmula (I) que el utilizado para obtener el inmunógeno; como antígenos de ensayo heterólogos, es decir obtenidos a partir de un compuesto de fórmula (I) diferente al empleado para obtener el inmunógeno. Se emplearon pipetas electrónicas de 8 canales para la dispensación rápida y precisa de los inmunorreactivos. Después de cada etapa de incubación, las placas se lavaron cuatro veces con una disolución de lavado, usando un lavador de 96 canales ELx405 (Biotek Instruments, Winooski, USA). La actividad peroxidasa usada como marcador se reveló con 100 µL por pocillo de una disolución 2 mg/mL de *o*-fenilendiamina en tampón 25 mM citrato sódico, 62 mM fosfato sódico, pH 5.4 conteniendo 0.012% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100 µL por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M. Al finalizar los ensayos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 492 nm usando una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de microplacas PowerWave HT (Biotek Instruments, Winooski, USA). Las curvas patrón sigmoideas obtenidas al representar la absorbancia frente a la concentración de analito se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando el paquete informático SigmaPlot de SPSS (Chicago, USA). El título del antisuero se definió como el recíproco de la dilución del antisuero que proporciona una señal máxima ( $A_{max}$ ) de 1.0 en ausencia de analito libre en

ensayo de ELISA competitivo en el formato de conjugado inmovilizado homólogo a 0.1 mg/mL con detección indirecta. La afinidad del anticuerpo ( $IC_{50}$ ) se estimó como la concentración de analito libre capaz de reducir a la mitad la señal máxima.

### 5 **3.1. Ensayos ELISA competitivos en formato de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta (ensayo indirecto)**

Las placas se tapizaron con 100  $\mu$ L por pocillo de una disolución de antígeno de ensayo que es un compuesto de fórmula (II) donde **P** es OVA a 0.01 o a 0.1  $\mu$ g/mL en tampón CB por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50  $\mu$ L por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50  $\mu$ L por pocillo de una dilución concreta de un determinado antisuero en PBST. La misma distribución de reactivos se repitió para cada placa con un conjugado diferente. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. A continuación, cada pocillo recibió 100  $\mu$ L de una dilución 1/10000 de GAR-HRP en PBST conteniendo 10% de suero bovino fetal. Esta reacción se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de lavar las placas, se reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito anteriormente.

### **3.2. Ensayos ELISA competitivos en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa (ensayo directo)**

Las placas se tapizaron con 100  $\mu$ L por pocillo de una dilución de antisuero en tampón CB por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50  $\mu$ L por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50  $\mu$ L por pocillo de una dilución concreta de un trazador enzimático determinado en PBST. La misma distribución de reactivos se repitió para cada placa con un antisuero diferente. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a



temperatura ambiente y después se lavaron las placas. Finalmente, se reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito.

## 4. Resultados

### 5 4.1. Respuesta inmune

Los cuatro inmunógenos de ciprodinil produjeron respuestas inmunes semejantes y equivalentes con títulos cercanos a  $3 \times 10^5$ . En la Figura 6 se muestran las señales obtenidas con los diferentes antisueros en ensayos con antígeno de ensayo homólogo para diferentes diluciones del antisuero.

#### 10 4.1.1. Determinación de la afinidad de los anticuerpos

Cada uno de los antisueros obtenidos se ensayó frente a su antígeno de ensayo homólogo usando el ensayo de tipo ELISA competitivo, tanto en formato de ensayo de antígeno inmovilizado con detección indirecta como en el formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa. Se ensayaron  
15 diferentes concentraciones de antígeno de ensayo frente a diferentes concentraciones de antisuero en ensayo competitivo utilizando como competidor diferentes concentraciones de ciprodinil preparadas por dilución seriada. Solamente a partir de tres de los compuestos de fórmula (I) sintetizados, CDm6, CDp6 y CDb5, se obtuvieron anticuerpos capaces de  
20 reconocer al ciprodinil con elevada afinidad. Este resultado confirma que dichas estructuras son idóneas para el objetivo que se persigue y demuestra la dificultad para predecir la posición óptima de funcionalización de los compuestos de fórmula (I). Los valores de la señal máxima, la  $IC_{50}$  y de la pendiente de la curva de inhibición resultante para cada anticuerpo con su  
25 antígeno de ensayo homólogo se han incluido en las Tablas 1 (a–d) y las Tablas 2 (a–d).

Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo de conjugado inmovilizado con detección indirecta:

**Tabla 1a**

OVA-CDm6					
Antisuero	Conjugado ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDm6#1	0.01	10	0.85	0.40	89.2
	0.1	300	0.84	0.48	60.1
CDm6#2	0.01	10	1.04	0.55	36.9
	0.1	300	0.96	0.52	25.5

**Tabla 1b**

OVA-CDp6					
Antisuero	Conjugado ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDp6#1	0.01	10	0.93	0.58	17.2
	0.1	100	1.27	0.47	25.8
CDp6#2	0.01	10	1.10	0.64	15.1
	0.1	100	1.24	0.45	23.8

**Tabla 1c**

OVA-CDb5					
Antisuero	Conjugado ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDb5#1	0.01	10	0.85	0.66	25.4
	0.1	300	0.73	0.58	15.8
CDb5#2	0.01	10	1.04	0.63	31.5
	0.1	300	0.89	0.56	15.8

**Tabla 1d**

OVA-CDn5					
Antisuero	Conjugado ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDn5#1	0.01	100	0.97	0.39	3356.7
	0.1	300	1.15	0.44	9555.8
CDn5#2	0.01	100	0.95	---	---
	0.1	300	1.21	0.95	6465.3

Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo de anticuerpo inmovilizado con detección directa:

**Tabla 2a**

HRP-CDm6					
Antisuero	Trazador ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDm6#1	3	10	1.18	0.47	19.8
	3	30	0.73	0.40	4.8
CDm6#2	3	10	1.19	0.64	31.0
	3	30	0.81	0.62	8.9

**Tabla 2b**

HRP-CDp6					
Antisuero	Trazador ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDp6#1	3	10	1.22	0.44	29.6
	3	30	0.74	0.55	9.9
CDp6#2	3	10	1.26	0.49	27.3
	3	30	0.92	0.64	7.8

**Tabla 2c**

HRP-CDb5					
Antisuero	Trazador ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDb5#1	3	10	1.25	0.66	5.8
	3	30	0.97	0.72	4.2
CDb5#2	1	10	1.15	0.76	3.9
	3	30	0.73	0.65	2.3

**Tabla 2d**

HRP-CDn5					
Antisuero	Trazador ( $\mu\text{g/mL}$ )	Título As. ( $\times 10^3$ )	Amax	Pendiente	IC <sub>50</sub> (nM)
CDn5#1	3	10	0.94	0.50	1035.5
	10	30	1.30	0.59	261.5
CDn5#2	3	10	0.91	0.53	1556.0
	10	30	1.23	0.69	278.5

En la Figura 7 se muestran las curvas de inhibición obtenidas con el formato de antígeno de ensayo inmovilizado con detección indirecta y con el formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa. Para el ensayo indirecto se

empleó 100  $\mu\text{L}$  por pocillo del compuesto de fórmula (II) OVA-CDp6 a 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el antisuero CDp6#1 a una dilución en ensayo de  $1/3 \times 10^4$ . En el caso del ensayo con formato directo, el pocillo se tapizó con 100  $\mu\text{L}$  de una dilución del antisuero CDb5#1 a  $1/3 \times 10^4$  y en la etapa competitiva se usó 0.3 ng de trazador enzimático homólogo.

Como se desprende de los resultados obtenidos en los ejemplos ilustrados, los inmunógenos en los que el compuesto de fórmula (I) contenía el espaciador situado sobre cualquiera de los dos anillos aromáticos proporcionaron anticuerpos de elevada afinidad para ciprodinil. Por el contrario, el inmunógeno con el espaciador sobre el nitrógeno amínico que une los dos anillos aromáticos proporcionó anticuerpos de baja afinidad hacia dicho fungicida.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):

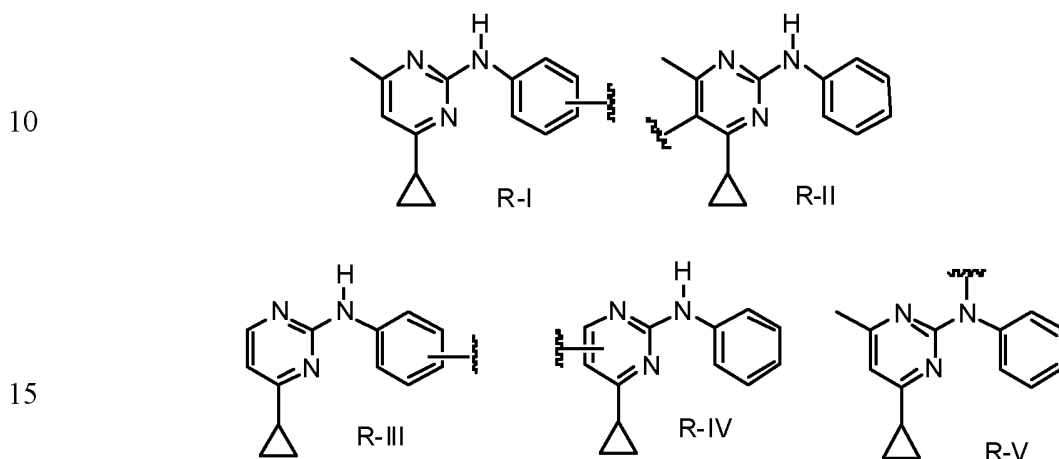
T-L-Y

5

(I)

caracterizado porque

T se selecciona del grupo que consiste en R-I, R-II, R-III, R-IV y R-V;



donde

R-I se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

R-II es [4-ciclopropil-6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo];

R-III se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

R-IV se selecciona del grupo que consiste en [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y [4-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo]; y

R-V es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena

30

hidrocarbonada comprende entre 0 y 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

**Y** es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en: -COOH, -NH<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>Br, -CH<sub>2</sub>I, -CHO, -SH, -SO<sub>3</sub>H, -OSO<sub>2</sub>Ph, -NH-NH<sub>2</sub>,  
5 -OSO<sub>2</sub>Ar y -C≡CH;

con la condición de que:

a) cuando **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], el fragmento-**L-Y** es diferente de -SCH<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>COOH;

b) cuando **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y **L** es -CH<sub>2</sub>-, **Y** es  
10 diferente a -NH<sub>2</sub>; y

c) cuando **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino], **L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada, con la condición de que dicha cadena hidrocarbonada no comprende ningún heteroátomo.

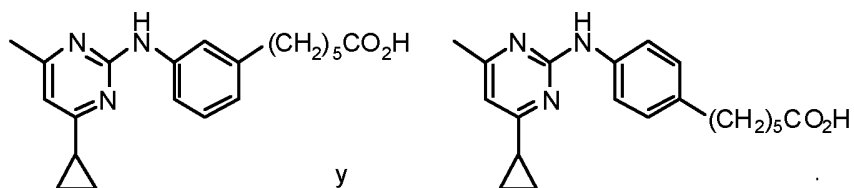
15 2. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono.

3. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque **Y** se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -NH<sub>2</sub> y -SH.

20 4. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono; e **Y** se selecciona dentro del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -NH<sub>2</sub> y -SH.

25 5. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 4, caracterizado porque se selecciona dentro del grupo que consiste en

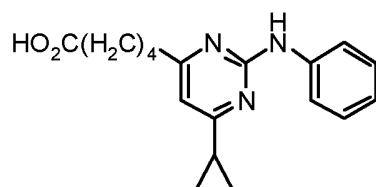
45



6. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono; e **Y** se selecciona dentro del grupo que consiste en  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{SH}$ .

7. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 6, caracterizado porque es

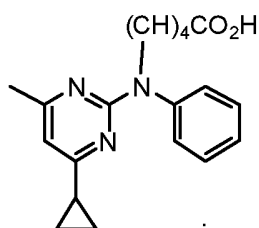
10



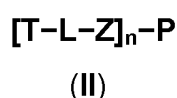
8. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono; e **Y** se selecciona dentro del grupo que consiste en  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{SH}$ .

9. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 8, caracterizado porque es

20



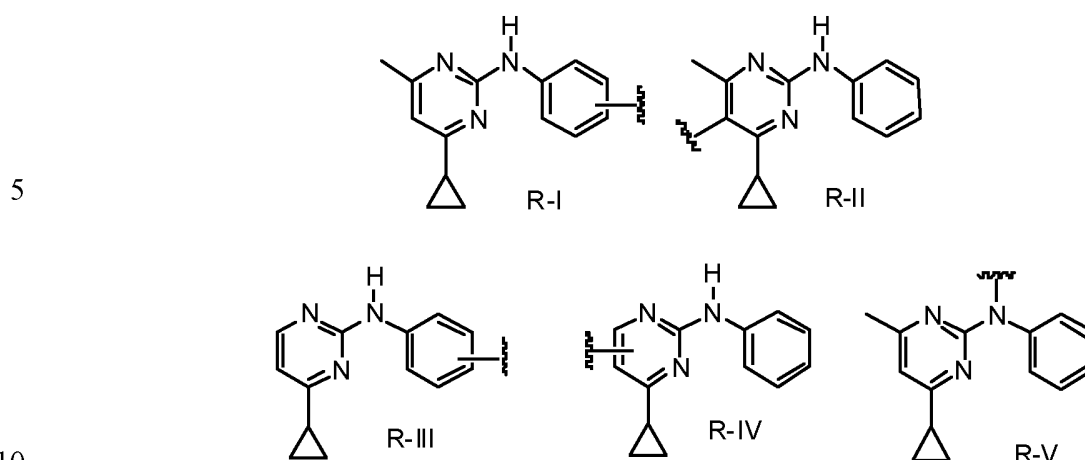
10. Un compuesto de fórmula (II):



caracterizado porque

25

T se selecciona del grupo que consiste en **R-I**, **R-II**, **R-III**, **R-IV** y **R-V**;



donde

**R-I** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

15 **R-II** es [4-ciclopropil-6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo];

**R-III** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

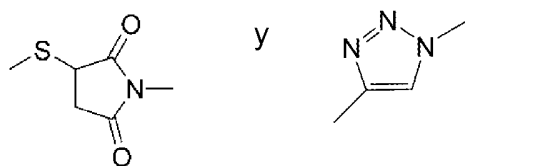
20 **R-IV** se selecciona del grupo que consiste en [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y [4-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo]; y

**R-V** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

25 **L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

**Z** es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NHCONH-, -NHCSNH-, -OCONH-, -NHOCO-, -OCSNH-, -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -OCO-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH-, -NR-,

30





**P** es un polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor de 2000 daltons; y

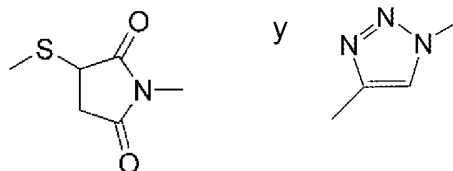
**n** es un número con un valor entre 1 y 500;

con la condición de que:

- 5 a) cuando **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], el fragmento **-L-Z-** es diferente de  $-\text{SCH}_2\text{CHNH}_2\text{COO}-$ ,  $-\text{SCH}_2\text{CHNH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$  o  $-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{NHCO}-$ ;
- b) cuando **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y **L** es  $-\text{CH}_2-$ , **Z** es diferente a  $-\text{NHCO}-$ ; y
- 10 c) cuando **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino], **L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada, con la condición de que dicha cadena hidrocarbonada no comprende ningún heteroátomo.

11. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 10, caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono.
- 15

12. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{NHCO}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,



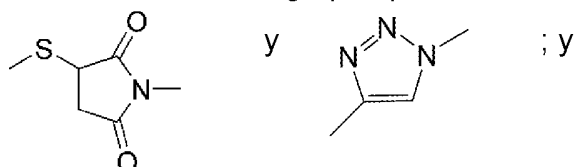
20

13. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

- 25 14. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{NHCO}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,



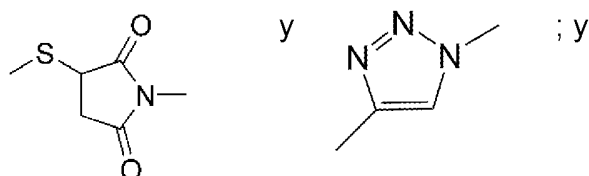
- 5 **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

15. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 14, caracterizado porque **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 5 átomos de carbono; **Z** es  $-\text{CONH}-$ ; **P** se selecciona del grupo que  
10 consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

16. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque

**T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo];

- 15 **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono; **Z** se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{NHCO}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,



- 20 **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

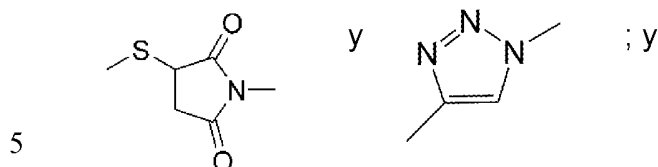
17. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 16, caracterizado porque **T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es  $-\text{CONH}-$ ; **P** se selecciona  
25 del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

18. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque

**T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

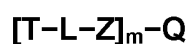
**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



**P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina,  $\beta$ -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

19. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 18, caracterizado porque **T** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

20. Un compuesto de fórmula (III):

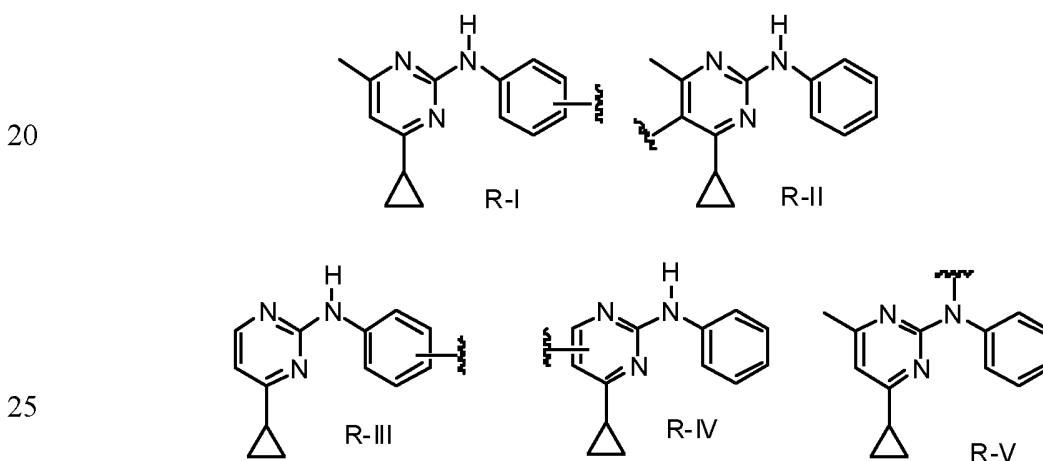


15

(III)

caracterizado porque

**T** se selecciona del grupo que consiste en **R-I**, **R-II**, **R-III**, **R-IV** y **R-V**;



donde

**R-I** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

30

**R-II** es [4-ciclopropil-6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo];

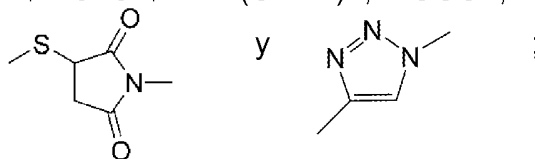
**R-III** se selecciona del grupo que consiste en [2-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo], [3-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo] y [4-((4-ciclopropilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

5 **R-IV** se selecciona del grupo que consiste en [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y [4-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo]; y

**R-V** es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

**L** es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono, donde la cadena es lineal o ramificada, saturada o insaturada, y dicha cadena  
10 hidrocarbonada comprende entre 0 y 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en S, O y N;

**Z** es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en -CONH-,  
-NHCO-, -NHCONH-, -NHCSNH-, -OCONH-, -NHOCO-, -OCSNH-,  
-SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -OCO-, -CO-, -CHOH-, -N=N-,  
15 -NH-, -NR-,



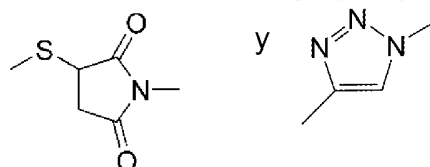
**Q** es un marcador no isotópico; y

**m** es un número entero con un valor entero entre 1 y 1000.

20 21. Un compuesto de fórmula (III) según la reivindicación 20, caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono.

22. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,

25



23. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizado porque **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de

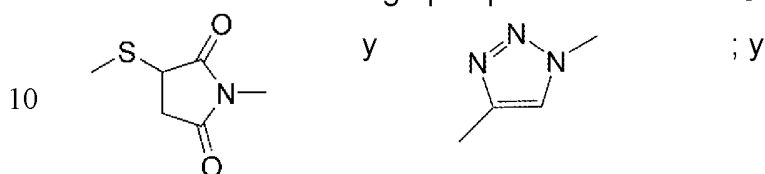
rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

24. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado porque

5 **T** es [3-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

**L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



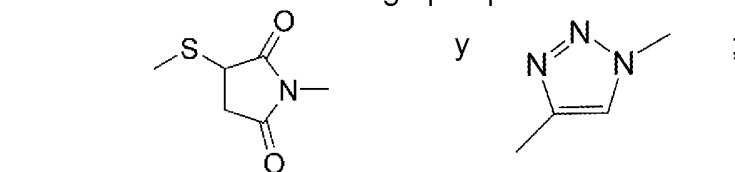
15 **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

25. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado porque

**T** es [6-ciclopropil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo];

20 **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

**Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



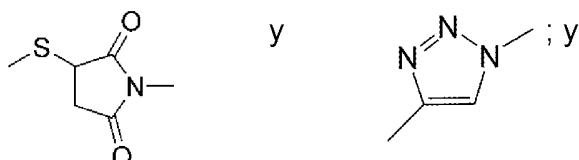
**Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

26. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado porque

T es [(4-ciclopropil-6-metilpirimidin-2-il)(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono;

5 Z se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



10 Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

15 27. Un anticuerpo generado en respuesta a un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19.

28. Método de análisis in vitro de ciprodinil en una muestra que comprende las siguientes etapas:

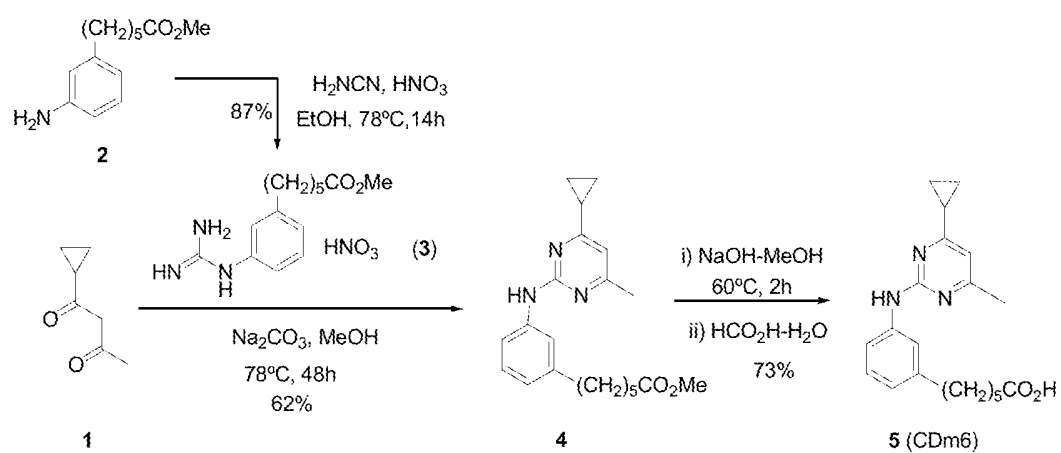
- a. poner en contacto una muestra con un anticuerpo generado tal como se describe en la reivindicación 27;
  - 20 b. incubar la muestra y el anticuerpo del paso (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica; y
  - c. determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación del paso (b).
- 25 29. Método de análisis de ciprodinil según la reivindicación 28, caracterizado porque la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un antígeno

de ensayo que es un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19.

30. Método de análisis de ciprodinil según la reivindicación 28, caracterizado porque la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza  
5 mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un antígeno de ensayo que es un compuesto de fórmula (III) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26.

31. Kit de detección de ciprodinil, que comprende al menos un anticuerpo generado tal como se define en la reivindicación 27 junto con un compuesto de  
10 fórmula (II) generado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 o un compuesto de fórmula (III) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26.

1/7





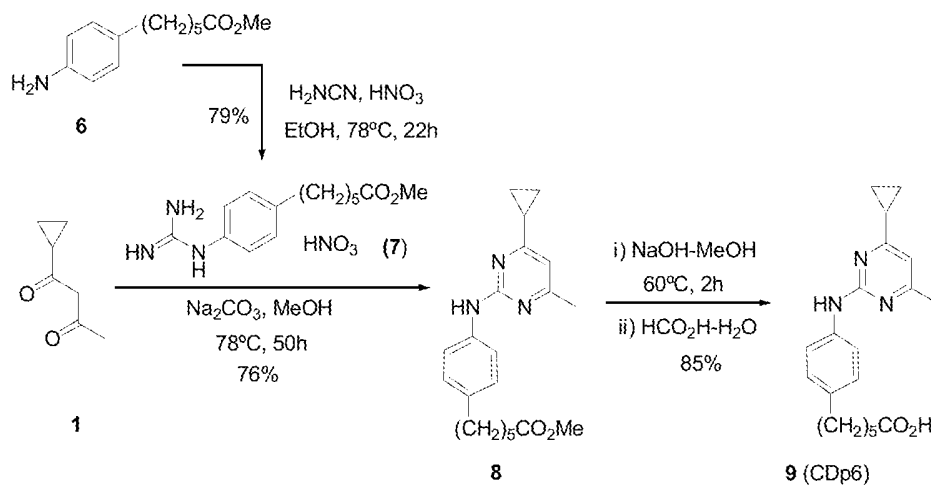


FIG.2

3/7

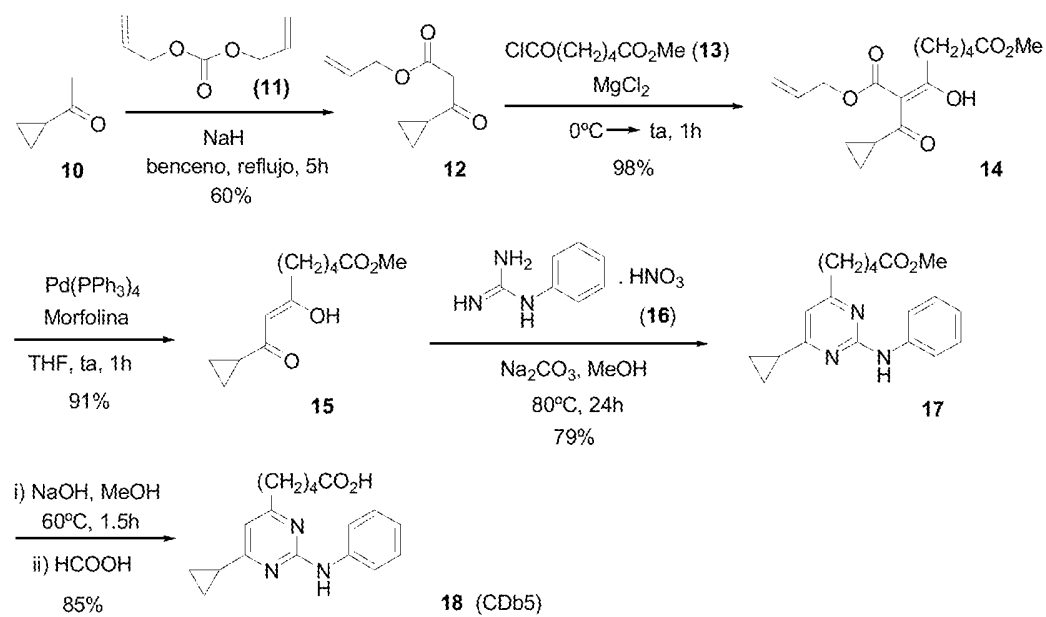


FIG.3

4/7

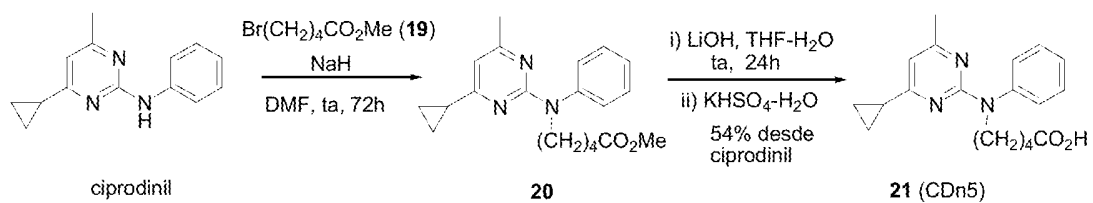


FIG.4

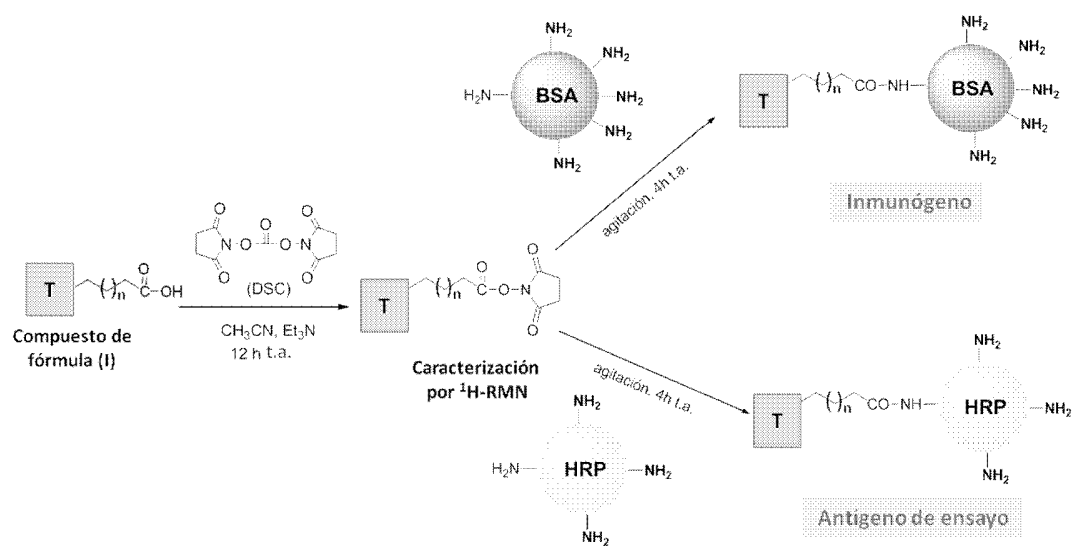


FIG.5

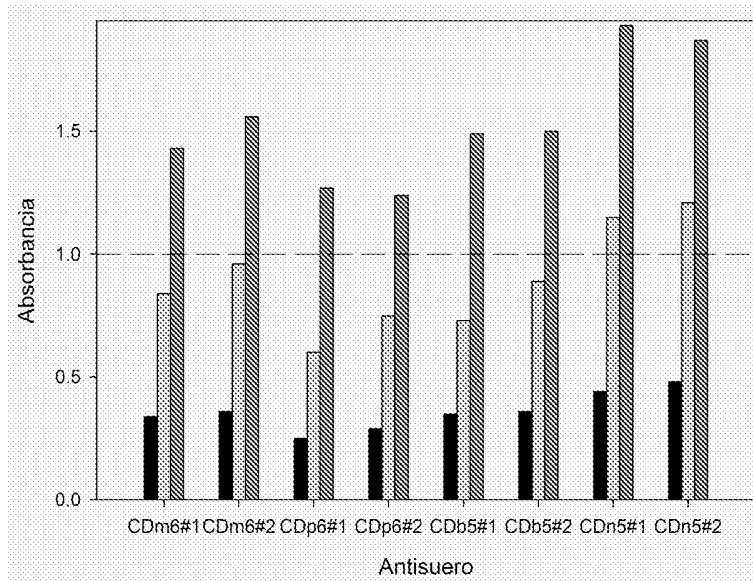


FIG.6

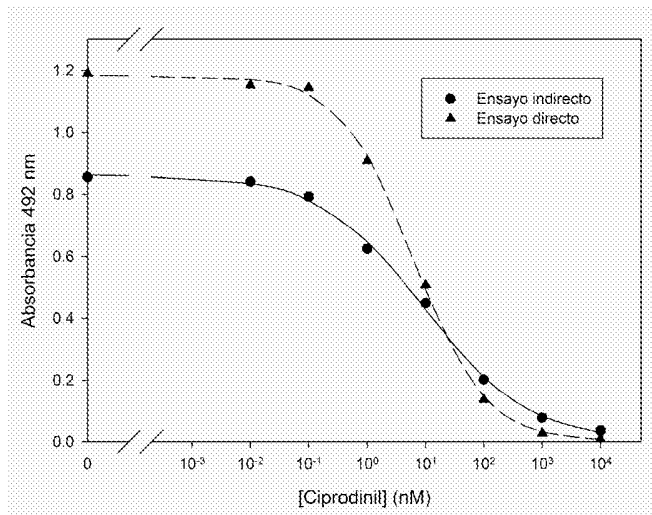


FIG.7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2012/070704

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K, C07D, G01N, C12N

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

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

**EPODOC,WPI,REGISTRY,CAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,XPESP,EMBASE,NPL,PUBMED,CHEMSPIDER**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ES 2081863 T3 (CIBA-GEIGY AG) 26.09.1990, page 1, lines 2-19; table 2, compounds 2.6, 2.27; table 3, compound 3.4.	1,2
X	US 4897396 A1 (HUBELE, A.) 30.06.1990, column 1, lines 2-14 and formula I; table, compounds 177,193.	1,2
X	US 5120741 A1 (ZONDLER, H.) 09.06.1992, column 1, lines 4-13, figure 1; table 1, compound 1.43; example 1.3.	1,2
X	EP 0457727 A1 (CIBA-GEIGY AG) 21.11.1991, page 3, lines 1-5 and formula 1; table 1, pages 22-23; table 2, page 30; table 3, page 33.	1,2
X	US 4931560 A1 (HUBELE, A.) 05.06.1990, column 1, lines 4-35; table 1, column 51, example 1.164.	1,2

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search  
**09/01/2013**

Date of mailing of the international search report  
**(21/01/2013)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
G. Esteban García

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

Telephone No. 91 3495425

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2012/070704

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAPP, M. et al. "Characterization of the bound residues of the fungicide cyprodinil formed in plant cell suspension cultures of wheat". Pest Management Science 2003, Volume 60, pages 65-74. [Available online 03.11.2003]. See page 65, abstract; page 66, figure 1.	1-31
A	XU, Y. et al. "Catalytic antibodies: hapten design strategies and screening methods". Bioorganic & Medicinal Chemistry 2004, Volumen 12, páginas 5247-5268. [Available online 11.09.2004]. See page 5247, abstract; page 5248, introduction; page 5265, conclusion. .	1-31



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070704

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2081863 T3	16.03.1996	HRP940514 A2	30.06.1996
		KR0143776B B1	15.07.1998
		JP2286666 A	26.11.1990
		JP3002786B2 B2	24.01.2000
		ZA9002166 A	28.12.1990
		HUT53490 A	28.11.1990
		BR9001304 A	02.04.1991
		AU5211490 A	27.09.1990
		AU632319B B2	24.12.1992
		YU54890 A	31.10.1991
		US5075316 A	24.12.1991
		SI9010548 A	31.10.1997
		PT93516 A	07.11.1990
		NZ233003 A	26.02.1991
		IL93813 A	31.07.1994
		DD293115 A5	22.08.1991
		CA2012566 A1	22.09.1990
		AR247388 A1	29.12.1994
		TR25912 A	01.11.1993
		FI95376B B	13.10.1995
FI95376C C	25.01.1996		
EP0388838 A2	26.09.1990		
DK0388838T T3	05.02.1996		
BG51157 A3	15.02.1993		
BG51433 A3	14.05.1993		
-----	-----	-----	-----
US 4897396 A	30.01.1990	NONE	
-----	-----	-----	-----
US5120741 A	09.06.1992	JP4211069 A	03.08.1992
		JP2984857B2 B2	29.11.1999
		HU206689 B	28.12.1992
		HUT56829 A	28.10.1991
		ZA9100877 A	30.10.1991
		IE910396 A1	14.08.1991
		FI910579 A	08.08.1991
		BR9100488 A	29.10.1991
		AU7083491 A	08.08.1991
		AU643744B B2	25.11.1993
		PT96670 A	31.10.1991
		NZ237015 A	26.03.1993
		CA2035729 A1	08.08.1991
		ES2089170T T3	01.10.1996
		EP0441747 A2	14.08.1991
		IL97026 A	24.01.1995
-----	-----	-----	-----
EP 0457727 A1	21.11.1991	NONE	
-----	-----	-----	-----
US 4931560 A	05.06.1990	CY1770 A	20.10.1995
		HRP940473 A2	30.04.1996
		MD206 B1	31.05.1995
		MD501 B1	29.03.1996
		HK21394 A	18.03.1994

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070704

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		MD38 B1	31.08.1994
		SG136093G G	31.03.1994
		LT1643 A	25.07.1995
		LT3874 B	25.04.1996
		DK85993 A	20.07.1993
		DK170161B B1	06.06.1995
		NO932441 A	29.03.1989
		LV10676 B	20.04.1996
		LV10556 B	20.04.1996
		LV10614 B	20.04.1996
		LV10613 B	20.04.1996
		CA1329934 C	31.05.1994
		CA1331759 C	30.08.1994
		RU2045520 C1	10.10.1995
		CN1064191 A	09.09.1992
		CN1034255C C	19.03.1997
		CN1064270 A	09.09.1992
		CN1024489C C	18.05.1994
		US5153200 A	06.10.1992
		US4997941 A	05.03.1991
		RU2017735 C1	15.08.1994
		RU2009134 C1	15.03.1994
		RU2043025 C1	10.09.1995
		RU2002416 C1	15.11.1993
		KR920006738B B1	17.08.1992
		JP1113374 A	02.05.1989
		JP6049689B B	29.06.1994
		IL102423 A	15.03.1993
		IL102422 A	10.06.1993
		IL87866 A	13.05.1993
		CN1032441 A	19.04.1989
		CN1017993B B	26.08.1992
		BG60541B B1	28.08.1995
		ZA8807223 A	29.04.1992
		YU180988 A	31.12.1990
		TR23617 A	30.04.1990
		RU2014327 C1	15.06.1994
		SK638588 A3	09.09.1998
		SK279313B B6	09.09.1998
		SI8811809 A	31.12.1996
		PT88596 A	01.10.1988
		PH26459 A	27.07.1992
		NO884284 A	29.03.1989
		NO176178B B	07.11.1994
		MX13166 A	01.09.1993
		IE62424 B1	08.02.1995
		IE882922L L	28.03.1989
		HU203879 B	28.10.1991
		HUT47787 A	28.04.1989

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070704

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C07K14/00* (2006.01)  
*C07D239/22* (2006.01)  
*G01N33/531* (2006.01)  
*G01N33/532* (2006.01)  
*C12N9/02* (2006.01)  
*C12N9/08* (2006.01)  
*C12N9/14* (2006.01)  
*C12N9/38* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070704

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

### Ver Hoja Adicional

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

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07K, C07D, G01N, C12N

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

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

EPODOC,WPI,REGISTRY,CAPLUS,MEDLINE,BIOSIS,XPESP,EMBASE,NPL,PUBMED,CHEMSPIDER

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ES 2081863 T3 (CIBA-GEIGY AG) 26.09.1990, página 1, líneas 2-19; tabla 2, compuestos 2.6, 2.27; tabla 3, compuesto 3.4.	1,2
X	US 4897396 A1 (HUBELE, A.) 30.06.1990, columna 1, líneas 2-14 y fórmula I; tabla, compuestos 177,193.	1,2
X	US 5120741 A1 (ZONDLER, H.) 09.06.1992, columna 1, líneas 4-13, figura 1; tabla 1, compuesto 1.43; ejemplo 1.3.	1,2
X	EP 0457727 A1 (CIBA-GEIGY AG) 21.11.1991, página 3, líneas 1-5 y fórmula 1; tabla 1, páginas 22-23; tabla 2, página 30; tabla 3, página 33.	1,2
X	US 4931560 A1 (HUBELE, A.) 05.06.1990, columna 1, líneas 4-35; tabla 1, columna 51, ejemplo 1.164.	1,2

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
09/01/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**21-ENERO-2013 (21/01/2013)**

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

Funcionario autorizado  
G. Esteban García

Nº de teléfono 91 3495425

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070704

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	SAPP, M. et al. "Characterization of the bound residues of the Fungicide cyprodinil formed in plant cell suspension cultures of wheat". Pest Management Science 2003, Volumen 60, páginas 65-74. [Disponible en línea el 03.11.2003]. Ver página 65, resumen; página 66, figura 1.	1-31
A	XU, Y. et al. "Catalytic antibodies: hapten design strategies and screening methods". Bioorganic & Medicinal Chemistry 2004, Volumen 12, páginas 5247-5268. [Disponible en línea el 11.09.2004]. Ver página 5247, resumen; página 5248, introducción; página 5265, conclusión.	1-31

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070704

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES 2081863 T3	16.03.1996	HRP940514 A2	30.06.1996
		KR0143776B B1	15.07.1998
		JP2286666 A	26.11.1990
		JP3002786B2 B2	24.01.2000
		ZA9002166 A	28.12.1990
		HUT53490 A	28.11.1990
		BR9001304 A	02.04.1991
		AU5211490 A	27.09.1990
		AU632319B B2	24.12.1992
		YU54890 A	31.10.1991
		US5075316 A	24.12.1991
		SI9010548 A	31.10.1997
		PT93516 A	07.11.1990
		NZ233003 A	26.02.1991
		IL93813 A	31.07.1994
		DD293115 A5	22.08.1991
		CA2012566 A1	22.09.1990
		AR247388 A1	29.12.1994
		TR25912 A	01.11.1993
		FI95376B B	13.10.1995
FI95376C C	25.01.1996		
EP0388838 A2	26.09.1990		
DK0388838T T3	05.02.1996		
BG51157 A3	15.02.1993		
BG51433 A3	14.05.1993		
-----	-----	-----	-----
US 4897396 A	30.01.1990	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
US5120741 A	09.06.1992	JP4211069 A	03.08.1992
		JP2984857B2 B2	29.11.1999
		HU206689 B	28.12.1992
		HUT56829 A	28.10.1991
		ZA9100877 A	30.10.1991
		IE910396 A1	14.08.1991
		FI910579 A	08.08.1991
		BR9100488 A	29.10.1991
		AU7083491 A	08.08.1991
		AU643744B B2	25.11.1993
		PT96670 A	31.10.1991
		NZ237015 A	26.03.1993
		CA2035729 A1	08.08.1991
		ES2089170T T3	01.10.1996
		EP0441747 A2	14.08.1991
		IL97026 A	24.01.1995
-----	-----	-----	-----
EP 0457727 A1	21.11.1991	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
US 4931560 A	05.06.1990	CY1770 A	20.10.1995
		HRP940473 A2	30.04.1996
		MD206 B1	31.05.1995
		MD501 B1	29.03.1996
		HK21394 A	18.03.1994

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070704

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		MD38 B1	31.08.1994
		SG136093G G	31.03.1994
		LT1643 A	25.07.1995
		LT3874 B	25.04.1996
		DK85993 A	20.07.1993
		DK170161B B1	06.06.1995
		NO932441 A	29.03.1989
		LV10676 B	20.04.1996
		LV10556 B	20.04.1996
		LV10614 B	20.04.1996
		LV10613 B	20.04.1996
		CA1329934 C	31.05.1994
		CA1331759 C	30.08.1994
		RU2045520 C1	10.10.1995
		CN1064191 A	09.09.1992
		CN1034255C C	19.03.1997
		CN1064270 A	09.09.1992
		CN1024489C C	18.05.1994
		US5153200 A	06.10.1992
		US4997941 A	05.03.1991
		RU2017735 C1	15.08.1994
		RU2009134 C1	15.03.1994
		RU2043025 C1	10.09.1995
		RU2002416 C1	15.11.1993
		KR920006738B B1	17.08.1992
		JP1113374 A	02.05.1989
		JP6049689B B	29.06.1994
		IL102423 A	15.03.1993
		IL102422 A	10.06.1993
		IL87866 A	13.05.1993
		CN1032441 A	19.04.1989
		CN1017993B B	26.08.1992
		BG60541B B1	28.08.1995
		ZA8807223 A	29.04.1992
		YU180988 A	31.12.1990
		TR23617 A	30.04.1990
		RU2014327 C1	15.06.1994
		SK638588 A3	09.09.1998
		SK279313B B6	09.09.1998
		SI8811809 A	31.12.1996
		PT88596 A	01.10.1988
		PH26459 A	27.07.1992
		NO884284 A	29.03.1989
		NO176178B B	07.11.1994
		MX13166 A	01.09.1993
		IE62424 B1	08.02.1995
		IE882922L L	28.03.1989
		HU203879 B	28.10.1991
		HUT47787 A	28.04.1989

**CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN**

*C07K14/00* (2006.01)  
*C07D239/22* (2006.01)  
*G01N33/531* (2006.01)  
*G01N33/532* (2006.01)  
*C12N9/02* (2006.01)  
*C12N9/08* (2006.01)  
*C12N9/14* (2006.01)  
*C12N9/38* (2006.01)