

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 056**

21 Número de solicitud: 201230098

51 Int. Cl.:

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

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

25.01.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.08.2013

Fecha de la concesión:

03.11.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.11.2014

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MERCADER BADIA, Josep Vicent;
ABAD FUENTES, Antonio;
ABAD SOMOVILLA, Antonio y
AGULLÓ BLANES, Consuelo**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Haptenos, conjugados y anticuerpos para el fungicida pirimetanil**

57 Resumen:

Haptenos, conjugados y anticuerpos para el fungicida pirimetanil.

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

ES 2 421 056 B1

DESCRIPCIÓN

**Haptenos, conjugados y anticuerpos para el fungicida
pirimetanil**

La presente invención se refiere a haptenos, conjugados, derivados
marcados y anticuerpos para pirimetanil. Además, la presente invención
5 también se refiere a un método de análisis de pirimetanil utilizando los
anticuerpos obtenidos, 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
10 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
15 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,
20 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
25 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 con aplicaciones en postcosecha destaca el pirimetanil [H.J. Rosslénbroich y D. Stuebler, *Crop Prot.* **2000**, *19*, 557–561]. Este plaguicida pertenece a la familia de las anilinoimidazoles cuyo modo bioquímico de acción es común a esta familia y diferente al del resto de fungicidas. El pirimetanil (4,6-dimetil-N-fenilimidazol-2-amina) es un producto desarrollado por AgrEvo y comercializado a nivel mundial por compañías como Bayer CropScience, BASF o Janssen Pharmaceutical. En la actualidad las denominaciones comerciales más habituales son Scala y Penbotec, encontrándose también en forma de formulaciones combinadas con una gran variedad de fungicidas diferentes, entre las que destacan Philabuster (con imazalil) y FlintStar (con trifloxistrobin). Su utilización como fungicida postcosecha está autorizada tanto en cítricos como en frutas de hueso y pepita. El pirimetanil fue incluido en el anexo I de la UE en el 2006. Entre los cultivos para los que la UE ha establecido límites máximos de residuos de forma explícita se encuentran los cítricos (10 ppm), frutas de hueso (3–10 ppm), frutas de pepita (5 ppm), uva y fresa (5 ppm), además de en una gran variedad de vegetales y hortalizas.

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 enzimoimmunoensayos. 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 pirimetanil en una muestra.

10 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 pirimetanil, fungicida ampliamente utilizado en la actualidad, preferentemente mediante la utilización de un kit que comprenda al menos un anticuerpo de pirimetanil.

15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

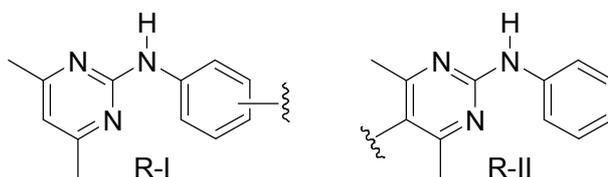
20 Un primer aspecto de la presente invención describe un compuesto de fórmula general (I):



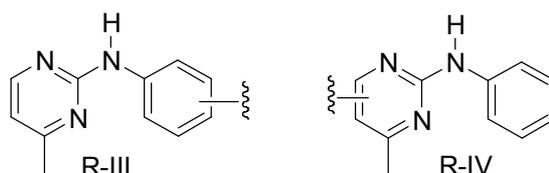
(I)

caracterizado porque

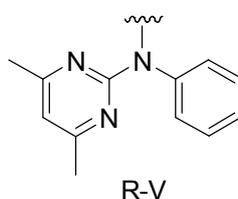
25 T se selecciona del grupo que consiste en R-I, R-II, R-III, R-IV y R-V;



5



10



donde

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

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

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

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

20 **R-V** es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada de 2 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

25 grupo que consiste en S, O y N;

Y es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en -COOH, -NH₂, -N₃, -CH₂Br, -CH₂I, -CHO, -SH, -SO₃H, -OSO₂Ph, -NH-NH₂, y -OSO₂Ar;

con la condición de que:

- a) cuando T es [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo], -L-Y es diferente de $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2$;
- b) cuando T es [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo], -L-Y es diferente de $-\text{CONHCH}_2\text{-CO}_2\text{H}$;
- 5 c) cuando T es [4-((4-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], -L-Y es diferente de $-\text{CHCH}_3\text{-CO}_2\text{H}$;
- d) cuando T es [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo], -L-Y es diferente de $-\text{OCH}_2\text{-CO}_2\text{H}$;
- e) cuando T es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino], L es una
10 cadena hidrocarbonada de 2 a 40 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada, con la condición de que dicha cadena hidrocarbonada no comprende ningún heteroátomo;
- f) cuando T es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino], -L-Y es diferente de $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$.

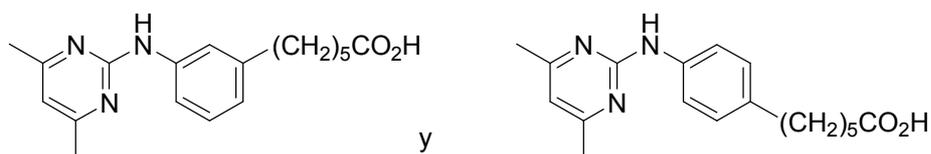
- 15 En la presente solicitud de patente se entiende por arilo (-Ar) un grupo carbocíclico aromático con un único anillo, por ejemplo fenilo, múltiples anillos, por ejemplo bifenilo, o múltiples anillos condensados donde al menos uno de ellos es aromático, por ejemplo 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1-naftilo, 2-naftilo. El grupo arilo puede estar sustituido o no. Preferentemente, el grupo arilo es 4-
20 metilfenilo.

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

- 25 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 fórmula (I) objeto de la presente invención se caracteriza porque Y es $-\text{COOH}$.

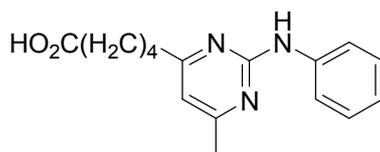
Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque **T** es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono; e **Y** se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -NH₂ y -SH.
 5 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.

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



Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque **T** es [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono; e **Y** se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -NH₂ y -SH. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada
 20 lineal de 2 a 8 átomos de carbono.

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

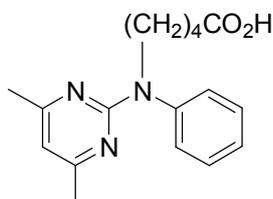


25

Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque **T** es [N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-N-(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono; e **Y** se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, NH₂ 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.

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

10



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

15



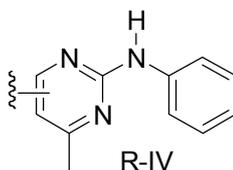
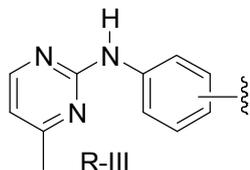
(II)

caracterizado porque

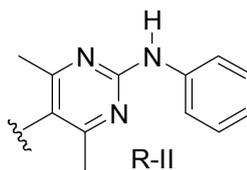
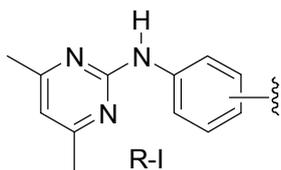
T se selecciona del grupo que consiste en **R-I**, **R-II**, **R-III**, **R-IV** y **R-V**;

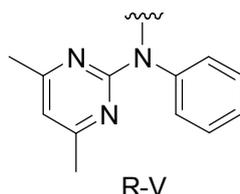
donde

20



25





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

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

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

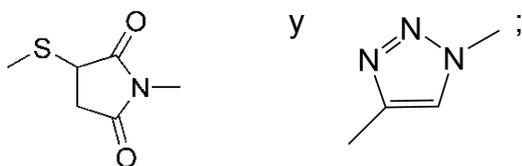
R-IV se selecciona del grupo que consiste en [6-metil-2-(fenilamino) pirimidin-4-ilo] y [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo]; y

R-V es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada de 2 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-,

20



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

25 **n** es un número con un valor entre 1 y 500.

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.

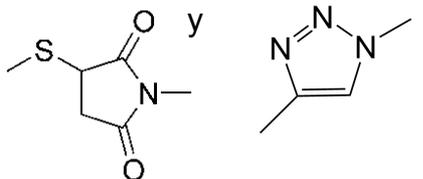
El compuesto de fórmula (II) de la presente invención puede utilizarse para la producción de anticuerpos o junto con un anticuerpo de pirimetanil, para determinar o detectar este fungicida en una muestra mediante la tecnología de in

5 inmunoen ensayo competitivo.

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

10 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-,



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, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa. Preferentemente, cuando **P** es albúmina, es albúmina de huevo o albúmina sérica.

20

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

25 **T** es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 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, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

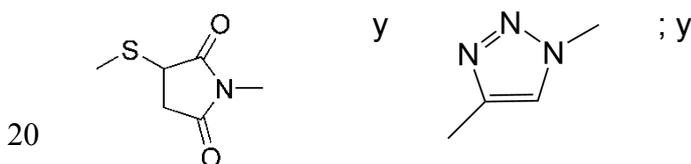
Según una realización aún más preferida, el compuesto de formula (II) de la presente invención se caracteriza porque **T** es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocbonada lineal de 5 átomos de carbono; **Z** es $-\text{CONH}-$; **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

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

L es una cadena hidrocbonada lineal de 2 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, β -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-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es $-\text{CONH}-$; **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

25

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

T es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

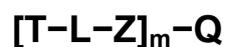
5 **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



10 **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -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 [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(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):



(III)

20 caracterizado porque

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.

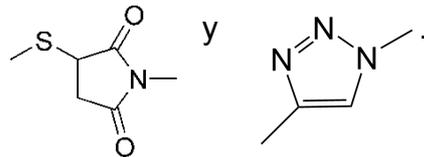
25 En la presente invención se entiende por marcador cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica

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 con un anticuerpo de pirimetanil para determinar o detectar este fungicida en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo competitivo.

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

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 luminiscente, un fluoróforo, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta, micro o nanopartículas u otros.

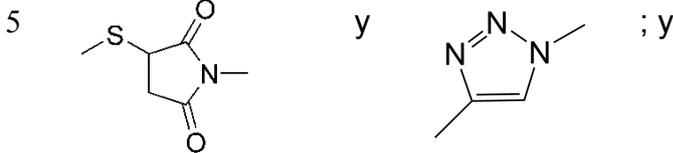
Preferentemente, **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o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

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

T es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

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



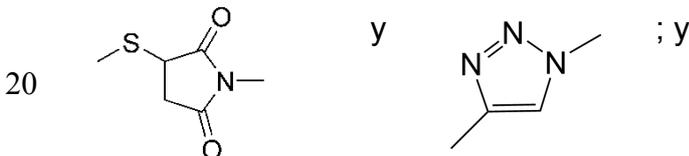
Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno
 10 cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de
 rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno
 cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas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

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

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

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

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



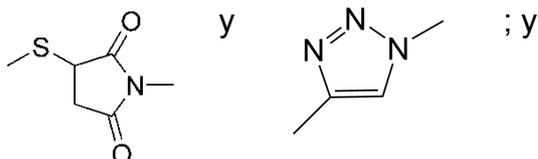
Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno
 cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de
 rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno
 25 cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas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

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

T es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

30 **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

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



- 5 **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.

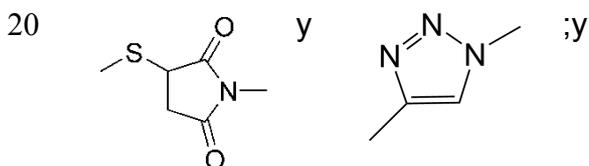
- 10 Un cuarto aspecto de la presente invención describe un anticuerpo generado en respuesta a un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en esta solicitud de patente.

- 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

T es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

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



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

- 25 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-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 5 átomos de

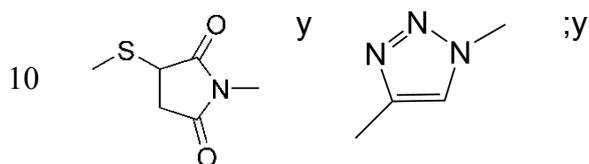
carbono; **Z** es -CONH-; **P** es albumina; y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

Según otra 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

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

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 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 y hemocianina.

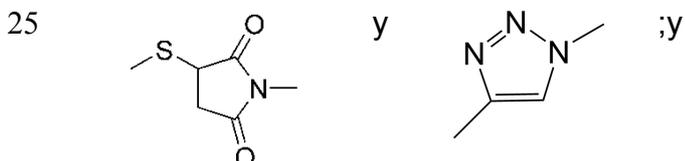
15 Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente, se caracteriza porque **T** es [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** es albúmina; y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

20 Según otra 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

T es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 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 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 [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** es albúmina; y **n** es un valor
5 seleccionado entre 1 y 50.

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

- 10 a. poner en contacto la muestra con el anticuerpo descrito 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
- 15 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 pirimetanil en una muestra. Así mismo, el método de la presente invención permite analizar el contenido de pirimetanil en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de
20 alimentos, muestras medioambientales tales como agua, suelo o superficie, y muestras biológicas tales como orina. Preferentemente, la presente invención proporciona un método de análisis in vitro de pirimetanil en un alimento.

Según una realización preferida, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo
25 competitivo, usando como competidor un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en esta solicitud de patente. Preferentemente, el inmunoensayo competitivo es de tipo ELISA.

Según otra realización preferida, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un compuesto de fórmula (III) tal como se describe en esta solicitud de patente. Preferentemente, el inmunoensayo competitivo es de tipo ELISA.

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 otra molécula por la unión con el anticuerpo.

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 (II) o de fórmula (III) que se utiliza en el ensayo competitivo.

Un sexto aspecto de la presente invención también se refiere a un kit de detección de pirimetanil que utiliza al menos un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente. Adicionalmente, el kit de detección de pirimetanil puede comprender un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (II) y 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.

5 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 no isotópico, por métodos ampliamente conocidos en la técnica.

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

15 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.

20 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.

25 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 anticuerpos generados a partir de un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en esta solicitud de patente pueden ser anticuerpos policlonales,

anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpo.

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 pirimetanil se requiere la preparación de derivados funcionalizados de dicho fungicida, es decir, análogos estructurales de pirimetanil 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 pirimetanil por un espaciador **L**. La posición de incorporación del grupo funcional a la estructura de pirimetanil para la conjugación no es un aspecto obvio y puede ser determinante para la viabilidad de los compuestos de fórmula (II) como inductores de la producción de anticuerpos de afinidad y selectividad adecuadas frente a pirimetanil e incluso de compuestos de fórmula (II) o (III) que actúen como moléculas competidoras y 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 figuras la forma en que puede efectuarse la preparación de varios derivados de pirimetanil que son compuestos de fórmula (I) y los correspondientes compuestos de fórmula (II), 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 compuesto de fórmula (II) 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 de los compuestos de fórmula (I) PMm6 y PMp6.

Figura 2. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) PMb5.

5 Figura 3. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) PMn5.

Figura 4. Esquema de la preparación de un compuesto de fórmula (II) a partir del correspondiente compuesto de fórmula (I), donde el término II-INM significa compuesto de fórmula (II) que se puede utilizar para generar un anticuerpo de pirimetanil, y el término II-ANT significa compuesto de fórmula (II) que puede actuar como competidor en un ensayo inmunológico competitivo.

Figura 5. Título de los anticuerpos anti-pirimetanil determinado con 0.1 μ g de compuesto de fórmula (II) homólogo inmovilizado.

Figura 6. Curvas estándar para pirimetanil en diferentes formatos de ELISA competitivo. Se indica mediante (●) los resultados obtenidos en el ensayo indirecto descrito en el apartado 3.1 de los ejemplos, y mediante (▲) los resultados obtenidos en ensayo directo descrito en el apartado 3.2 de los ejemplos.

EJEMPLOS

20 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de fórmula (II) para la obtención de anticuerpos anti-pirimetanil. 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

25 3. 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 PMm6 (**2**) y PMp6 (**3**) [radical de tipo **T= R-I**]

La síntesis de los compuestos PMm6 (**2**) y PMp6 (**3**) se describe en la Figura 5 1 e implica la reacción de sustitución nucleofílica aromática del átomo de cloro de la 2-cloro-4,6-dimetil-pirimidina (**1**) por el grupo amino del correspondiente ácido aminofenilalcanoico que incorpora la cadena hidrocarbonada de seis átomos de carbono que constituye el brazo espaciador (C. Suárez-Pantaleón et al., *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 11122–11131). La reacción tiene lugar sin 10 necesidad de catálisis básica o ácida, produciéndose eficazmente por calentamiento prolongado de los dos reactantes en dioxano como disolvente a reflujo. A continuación se ilustran los detalles de la preparación y caracterización de este compuesto de fórmula (I).

Síntesis del ácido 6-(3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenil)hexanoico

15 (**2**, compuesto PMm6)

Una mezcla de 2-cloro-4,6-dimetilpirimidina (**1**, 71 mg, 0.5 mmol) y ácido 6-(3-aminofenil)hexanoico (103 mg, 0.5 mmol) en dioxano seco recién destilado se calienta a reflujo con agitación bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se concentra a sequedad a presión reducida en el rotavapor. El 20 residuo obtenido se disuelve en la mínima cantidad de ácido fórmico (aproximadamente 0.2 mL) y el producto se precipita por adición lenta de agua (aproximadamente 3 mL). El sólido precipitado se recoge por filtración a vacío y se seca, obteniéndose el hapteno PMm6 (**2**) como un sólido blanco (109 mg, 25 70%). Pf: 199–202 °C (cristalizado de DMSO–H₂O); ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 11.97 (1H, sa, COOH), 9.35 (1H, s, N-H), 7.64 (1H, da, *J* = 8.0 Hz, H-2/H-6 Ph), 7.60 (2H, sa, H-2 Ph), 7.13 (1H, ta, *J* = 7.7 Hz, H-5 Ph), 6.72 (1H, da, *J* = 7.6 Hz, H-4 Ph), 6.60 (1H, s, H-5 Pirim), 2.30 (6H, s, Mex₂),

2.50 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-6), 2.20 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2), 1.54 (4H, m, H-3 y H-5), 1.30 (2H, m, H-4); ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 174.4 (C-1), 166.7 (C-4 and C-2 Pirim), 159.7 (C-6 Pirim), 142.1 (C-3 Ph), 140.7 (C-1 Ph), 128.1 (C-5 Ph), 120.9 (C-6 Ph), 118.5 (C-4 Ph), 115.9 (C-2 Ph), 110.8 (C-5 Pirim), 35.2 (C-6), 33.5 (C-2), 30.5 (C-5), 28.1 (C-4), 24.3 (C-3), 23.4 (Mex2); IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3284, 3207, 3142, 3104, 2945, 2918, 2858, 2600-2400, 1689, 1618, 1596, 1558, 1492, 880, 776, 744, 552; EM (Impacto Electrónico, 70 Ev) m/z (%) 313 (M $^+$, 77), 312 (20), 254 (12), 226 (81), 213 (80), 212 (20), 199 (12), 198 (4), 73 (100); EMAR, m/z (M $^+$) encontrada para $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ 313.17882, requerida 313.17903.

Síntesis del ácido 6-(4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenil)hexanoico (3, compuesto PMp6)

Una mezcla de 2-cloro-4,6-dimetilpirimidina (**1**, 142.8 mg, 1.00 mmol) y ácido 6-(4-aminofenil)hexanoico (207 mg, 1.00 mmol) en dioxano seco recién destilado se calentó a reflujo con agitación bajo atmósfera de nitrógeno durante 30 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a sequedad a presión reducida en el rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en aproximadamente 0.5 mL de ácido fórmico y el producto se precipitó por adición lenta de agua (aproximadamente 3 mL). El sólido precipitado se recogió por filtración a vacío y se secó, obteniéndose el compuesto PMp6 (**3**) como un polvo blanco (235 mg, 75%). Pf: 180–183 °C (cristalizado de DMSO– H_2O); ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.98 (1H, sa, COOH), 9.33 (1H, s, N-H), 7.67 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2/H-6 Ph), 7.06 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3/H-5 Ph), 6.58 (1H, s, H-5 Pirim), 2.47 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 2.29 (6H, s, Mex2), 2.19 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2), 1.52 (4H, m, H-3 y H-5), 1.28 (2H, m, H-4); ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 174.4 (C-1), 166.8 (C-4/ C-6 Pirim), 159.7 (C-2 Pirim), 138.5 (C-4 Ph), 134.5 (C-1 Ph), 128.1 (C-3/C-5 Ph), 118.5 (C-2/C-6 Ph), 110.6 (C-5 Pirim), 34.3 (C-6), 33.6 (C-2), 30.8 (C-5), 28.1 (C-4), 24.3 (C-3), 23.4 (Mex2); IR (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3295, 3202, 3125, 3082, 2918, 2847, 2600–2400, 1698, 1618, 1585, 1547, 1410, 1377, 1274, 842,

733, 634, 547, 504; EM (Impacto Electrónico, 70 Ev) m/z (%): 313 (M+, 45), 312 (9), 238 (3), 226 (5), 213 (7), 212 (100), 211 (4); EMAR, m/z (M⁺): encontrada para C₁₈H₂₃N₃O₂ 313.17896, requerida 313.17903.

Ejemplo 2: Síntesis del compuesto PMb5 (**8**) [radical del tipo T= R-IV]

5 La síntesis del compuesto que incorpora el brazo 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 brazo espaciador del compuesto en cuestión. Una vez
10 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 2, la preparación del compuesto 1,3-dicarbonílico (**6**) se lleva a cabo a través de la reacción de acilación del 3-oxobutanoato de alilo (**4**) con el 6-cloro-6-oxohexanoato de metilo, seguido de reacción de desalilación-descarboxilativa catalizada por
15 Pd(0). La condensación de la 1,3-dicetona (**6**) con el nitrato de fenilguanidinio en medio básico genera el esqueleto completo del compuesto de fórmula (**I**) cuya síntesis finaliza con la hidrólisis del éster metílico de (**7**) con base. A continuación se ilustran los detalles de la preparación y caracterización de este compuesto de fórmula (**I**) y todos los intermedios de su síntesis.

20 i) *Síntesis de 8-metil 2-acetil-3-oxooctanedioato de 1-alilo (5)*

3-Oxobutanoato de alilo (**4**, 0.288 mL, 2.1 mmol) se adicionó gota a gota sobre una suspensión agitada de MgCl₂ anhidro (200 mg, 2.1 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2.5 mL) bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La
mezclase enfrió a 0 °C en un baño de hielo y se adicionó piridina seca (0.339
25 mL, 4.2 mmol). La agitación se continuó a esta temperatura durante 15 minutos y se adicionó gota a gota el 6-cloro-6-oxohexanoato de metilo (0.327 mL, 2.1 mmol), tras lo cual se mantuvo la agitación a 0 °C durante 15 minutos adicionales. Seguidamente se retiró el baño de hielo y la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación se enfrió de

nuevo la mezcla en un baño de hielo y se adicionó HCl 6 M hasta pH ácido (aproximadamente 1.5 mL), se diluyo con agua y se extrajo con éter etílico. Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, obteniéndose el compuesto **5** (580 mg, 97%) como un aceite incoloro denso que no requiere purificación y cuyo espectro de ¹H RMN muestra que se encuentra exclusivamente en la forma tautomérica ceto-enólica. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 15.6 (1H, sa, OH), 5.98 (1H, ddt, *J* = 17.2, 10.3, 6.0 Hz, HC=), 5.37 (1H, dq, *J* = 17.2, 1.4 Hz, =CH₂), 5.29 (1H, dq, *J* = 10.3, 1.1 Hz, =CH₂), 4.70 (2H, dt, *J* = 6.0, 1.2 Hz, OCH₂), 3.66 (3H, s, CO₂CH₃), 2.66 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, H-4), 2.36 (3H, s, CH₃CO), 2.33 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, H-7), 1.67 (4H, m, H-5 y H-6); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 198.8 (COCH₃), 195.8 (C-3), 173.7 (CO₂CH₃), 166.8 (C-1), 131.8 (HC=), 119.3 (=CH₂), 108.3 (C-2), 65.6 (OCH₂), 51.5 (CO₂CH₃), 37.5 (C-4), 33.7 (C-7), 25.7 (COCH₃), 25.0 (C-6), 24.5 (C-5); IR (NaCl) *v*_{max}/cm⁻¹: 2951, 2869, 1732, 1711, 1563, 1437, 1219, 1077, 755; EM (Impacto Electrónico, 70 Ev) *m/z* (%): 284 (M⁺, 1.7), 226 (12), 211 (13), 194 (21), 177 (7), 169 (199), 153 (84), 143 (58); EMAR, *m/z* (M⁺): encontrada para C₁₄H₂₀O₆ 284.12639, requerida 284.12599.

ii) *Síntesis del 6,8-dioxononanoato de metilo (6)*

Sobre una disolución de Pd(OAc)₂ en THF seco (1.5 mL) se añadieron de forma consecutiva ácido fórmico (0.064 mL, 1.7 mL) y Et₃N (0.113 mL, 0.81 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Tras unos minutos de agitación se adicionó una disolución del compuesto **5** (200 mg, 0.70 mmol) en THF seco (1.5 mL) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una pequeña columna de sílice usando éter etílico para el lavado. La disolución etérea obtenida se lavó con agua, disolución saturada de NaCl, se secó, se filtró y se concentró a sequedad, obteniéndose el compuesto **6** (127 mg, 90%) un aceite viscoso, cuyo espectro de ¹H RMN muestra que se trata de una mezcla en equilibrio de las formas tautoméricas ceto-enólica (72%) y

dicarbonílica (28%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm, sólo señales del tautómero ceto-enólico): 15.45 (1H, sa, OH), 5.49 (1H, s, H-7), 3.67 (3H, s, CO_2CH_3), 2.29 (4H, m, H-2 y H-5), 2.05 (3H, s, CH_3CO), 1.65 (4H, m, H-3 y H-4); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm, sólo señales del tautómero ceto-enólico): 193.6 (C-8), 191.4 (C-6), 173.8 (C-1), 99.8 (C-7), 51.5 (OCH_3), 37.8 (C-5), 33.7 (C-2), 25.0 (C-3), 24.9 (C-9), 24.4 (C-4); IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2945, 2869, 1738, 1618, 1432, 1203, 1170, 782; EM (Impacto Electrónico, 70 Ev) m/z (%): 200 (M^+ , 20), 182 (3), 169 (11), 168 (8), 143 (24), 127 (16), 126 (12), 115 (13), 114 (19), 113 (28), 111 (54), 100 (42), 85 (100); EMAR, m/z (M^+):
 5 encontrada para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4$ 200.10514, requerida 200.10486.
 10

iii) *Síntesis del 5-(6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-il)pentanoato de metilo (7)*

Se introdujeron en una ampolla de vidrio nitrato de *N*-fenilguanidinio (175 mg, 0.88 mmol), Na_2CO_3 (47 mg, 0.44 mmol), dicetona **6** (161 mg, 0.8 mmol) y
 15 una pequeña varilla magnética recubierta de PTFE. La ampolla se purgó con nitrógeno, se añadió EtOH (3 mL), se cerró a vacío y se calentó en un baño a 80 °C con buena agitación durante 18 h. Al cabo de este tiempo se abrió la ampolla, la mezcla de reacción se transfirió a un matraz de fondo redondo y se eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido se cromatografió de
 20 gel de sílice, usando hexano–EtOAc 9:1 como eluyente, para obtener el compuesto **7** (169 mg, 70%) como un aceite. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.66 (2H, da, $J = 8.2$ Hz, H-2/H-6 Ph), 7.31 (2H, ta, $J = 7.5$ Hz, H-3/H-5 Ph), 7.04 (1H, sa, NH), 7.00 (1H, tt, $J = 7.5, 1.2$ Hz, H-4 Ph), 6.47 (1H, s, H-5 Pirim), 3.67 (3H, s, CO_2CH_3), 2.62 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5), 2.38 (3H, s, CH_3 -Pirim), 2.37 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 1.74 (4H, m, H-3 y H-4); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.9 (C-1), 170.7 (C-4 Pirim), 167.7 (C-6 Pirim), 159.7 (C-2 Pirim), 139.9 (C-1 Ph), 128.8 (C-3/C-5 Ph), 121.9 (C-4 Ph), 118.6 (C-2/C-6 Ph), 111.1 (C-5 Pirim), 51.5 (OCH_3), 37.2 (C-5), 33.9 (C-2), 27.9 (C-4), 24.6 (C-3), 24.0 (CH_3 -Pirim); IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3359, 2945, 2858, 1739, 1585, 1432,
 25

750, 689; EMAR, m/z (M^+): encontrada para $C_{17}H_{21}N_3O_2$ 299.16321, requerida 299.16338.

iv) *Síntesis del ácido 5-(6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-il)pentanoico*
(**8**, compuesto PMb5)

5 Una disolución acuosa de NaOH 2M (1 mL) se añadió sobre una disolución del éster metílico **7** (167 mg, 0.56 mmol) en MeOH (3 mL) y la mezcla se calentó a reflujo con agitación durante 1.5 h. Al cabo de este tiempo se eliminó el disolvente en el rotavapor y el residuo seco obtenido se disolvió en la mínima cantidad de HCO_2H y posteriormente se adicionó agua hasta la total precipitación del producto que se recogió por filtración a vacío, el sólido
10 recogido se lavó con agua fría y se secó para obtener el compuesto PMb5 (143 mg, 90%) como un sólido blanco. Pf: 201–204 °C (cristalizado de DMSO– H_2O); 1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.06 (1H, sa, COOH), 9.44 (1H, sa, NH), 7.80 (2H, da, $J = 7.6$ Hz, H-2/H-6 Ph), 7.24 (2H, ta, $J = 7.9$ Hz, H-3/H-5
15 Ph), 6.89 (1H, tt, $J = 7.3, 1.2$ Hz, H-4 Ph), 6.62 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-5 Pirim), 2.57 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-5), 2.32 (3H, s, CH_3 -Pirim), 2.25 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 1.69 (2H, m, H-4), 1.54 (2H, m, H-3); ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 174.3 (C-1), 170.3 (C-4 Pirim), 167.0 (C-6 Pirim), 159.7 (C-2 Pirim), 140.9 (C-1 Ph), 128.3 (C-3/C-5 Ph), 120.7 (C-4 Ph), 118.4 (C-2/C-6 Ph), 110.4
20 (C-5 Pirim), 36.4 (C-5), 33.4 (C-2), 27.4 (C-4), 24.1 (C-3), 23.5 (CH_3 -Pirim); IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3295, 3202, 3082, 2918, 2852, 2503, 1694, 1618, 1585, 1552, 1508, 1372, 842, 727; EM (Impacto Electrónico, 70 Ev) m/z (%): 285 (M^+ , 10), 284 (2), 226 (7), 212 (5), 199 (40), 178 (7), 73 (100); EMAR, m/z (M^+) encontrada para $C_{16}H_{19}N_3O_2$ 285.14819, requerida 285.14773.

25 Ejemplo 3: Síntesis del compuesto PMn5 (**11**) [radical del tipo **T= R-VII**]

La síntesis del compuesto de fórmula (**I**) que incorpora el brazo espaciador por el nitrógeno amínico de pirimetanil se lleva a cabo a través de una reacción de alquilación del anión amiduro derivado del mismo con el ω -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 3 y se detalla a continuación.

i) Síntesis del 5-((4,6-dimetipirimidin-2-il)(fenil)amino)pentanoato de metilo (**10**)

En un matraz de fondo redondo se pesó hidruro sódico al 60% en aceite
5 mineral (24.1 mg, 0.60 mmol) y a continuación se lavó tres veces con pentano
seco bajo atmósfera de nitrógeno, secándolo después con una corriente suave
del mismo gas. El polvo blanco suelto resultante se suspendió en
dimetilformamida seca (1.5 mL) y sobre la suspensión obtenida se añadió gota a
gota con agitación una disolución de pirimetanil (**9**, 100 mg, 0.5 mmol) en
10 dimetilformamida seca (1.5 mL) a temperatura ambiente. La mezcla, que va
adquiriendo una coloración amarillenta, se agitó bajo nitrógeno durante 1 h y a
continuación se añadió vía jeringa 5-bromoalerato de metilo (0.148 mL, 1
mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante
aproximadamente 72 h, se vertió sobre agua y se extrajo con EtOAc. Los
15 extractos orgánicos reunidos se lavaron sucesivamente con agua, disolución
20% de LiCl y disolución saturada de NaCl. Se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro,
se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó
por cromatografía de columna sobre gel de sílice, usando hexano–EtOAc 9:1
como eluyente, para obtener una mezcla aproximadamente 1:2 del pirimetanil
20 inicial no reaccionado y 5-((4,6-dimetipirimidin-2-il)(fenil)amino)pentanoato de
metilo (**10**) (145 mg).

ii) Síntesis del ácido 5-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)(fenil)amino)pentanoico
(**11**, compuesto PMn5)

A una disolución de la mezcla anterior en THF se añadió gota a gota agua
25 (0.85 mL) y posteriormente LiOH·H₂O sólido (81.6 mg, 1.94 mmol). La mezcla
resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente se
eliminó el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido se diluyó en H₂O
(3 mL) y se acidificó cuidadosamente con KHSO₄ sólido hasta pH 3–4. La
mezcla resultante se extrajo con EtOAc, las fases orgánicas reunidas se

secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, usando CHCl_3 -MeOH 9:1 como eluyente, para obtener pirimetanil no reaccionado (36 mg) seguido del compuesto PMn5 (**11**) como un aceite denso
5 (89.8 mg, 60% desde pirimetanil). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.36 (2H, m, H-3/H-5 Ph), 7.27 (2H, m, H-2/H-6 Ph), 7.18 (1H, tt, $J = 7.2, 1.5$ Hz, H-4 Ph), 6.32 (1H, s, H-5 Pirim), 4.04 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-5), 2.37 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 2.24 (6H, s, Mex2), 1.66 (4H, m, H-3 y H-4); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 179.0 (C-1), 166.9 (C-4/ C-6 Pirim), 161.7 (C-2 Pirim), 144.5
10 (C-1 Ph), 128.8 (C-3/C-5 Ph), 127.5 (C-2/C-6 Ph), 125.3 (C-4 Ph), 109.9 (C-5 Pirim), 49.5 (C-5), 33.7 (C-2), 27.2 (C-4), 24.0 (Mex2), 21.8 (C-3); IR (NaCl) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3044, 2928, 2864, 1708, 1578, 1563, 1498, 1475, 1376, 1339, 1219, 694; EM (Impacto Electrónico, 70 Ev) m/z (%): 299 (M^+ , 21), 298 (10), 226 (24), 224 (5), 213 (16), 212 (100), 209 (11), 208 (17), 207 (84), 200 (2), 199 (15), 198
15 (25); EMAR, m/z (M^+): encontrada para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ 299.16426, requerida 299.16338.

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
20 portadoras, concretamente por reacción con los grupos amino libres de la proteína. El grupo carboxilo se activó 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
25 pirimetanil 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 durante toda la noche. La disolución se diluyó en cloroformo, se lavó con una disolución saturada de NaHCO_3 y salmuera y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Después de evaporar el disolvente, el residuo
30 restante se purificó por cromatografía en columna, usando cloroformo como

eluyente, obteniéndose el éster de *N*-hidroxisuccinimida del compuesto de fórmula (I) de pirimetanil en forma pura.

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

5 Tampones y disoluciones:

PB: Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4;

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

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

10 CB: Tampón carbonato sódico 50 mM, pH 9.6;

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

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

15 Los compuestos de fórmula (II) se prepararon como se esquematiza en la Figura 4, según los procedimientos siguientes.

1.3.1. Compuesto de fórmula (II) donde **P** es BSA

20 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 compuesto de fórmula (II) se purificó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación, *n* tal como se describe en el compuesto de fórmula (II), medido espectrofotométricamente fue de 16, 11, 25 14 y 14 para PMm6, PMp6, PMb5 y PMn5, respectivamente.

1.3.2. Compuesto de fórmula (II) donde **P** es OVA

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 μ L de una disolución 100 mM del 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 en Sephadex G-25 usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación, *n* tal como se describe en el compuesto de fórmula (II), medido espectrofotométricamente fue de 12, 8, 8 y 9 moléculas para PMm6, PMp6, PMb5 y PMn5, respectivamente.

10 1.3.3. Compuesto de fórmula (II) donde **P** es HRP

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 μ L de una disolución 10 mM (o 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 compuesto de fórmula (II) se purificó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación, *n* tal como se describe en el compuesto de fórmula (II), medido espectrofotométricamente fue de 7, 6, 5 y 3 para PMm6, PMp6, PMb5 y PMn5, respectivamente.

20 **2. Inmunización de conejos**

Se inmunizaron, siguiendo protocolos estandarizados, 2 hembras de conejo blancas de la raza New Zealand con cada compuesto de fórmula (II) donde **P** es BSA obtenido 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 compuestos de fórmula (II) 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 conjugado 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. Se obtuvieron dos anticuerpos de cada compuesto de fórmula (II) donde **P** es BSA, identificados como #1 y #2.

3. Procedimiento ELISA

Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada anticuerpo 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, 62 mM fosfato, pH 5.4 conteniendo 0.012% (v/v) de H₂O₂. Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100 µL por pocillo de H₂SO₄ 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 anticuerpo se definió como el recíproco de la dilución del anticuerpo que proporciona una señal máxima (A_{max}) alrededor 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 (IC₅₀) se estimó como la concentración de analito libre capaz de reducir a la mitad la señal máxima.

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

Las placas se tapizaron con 100 µL 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 µg/mL en tampón CB por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50 µL por pocillo de una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50 µL por pocillo de una dilución concreta de un determinado anticuerpo en PBST. La misma distribución de reactivos se repitió para cada placa con un antígeno de ensayo 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 µL de una dilución 1/10⁴ 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 µL por pocillo de una dilución de anticuerpo en tampón CB por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, en cada columna se dispensó 50 µL por pocillo de

una curva estándar completa del analito en PBS seguido de 50 μ L por pocillo de una dilución concreta en PBST de un trazador enzimático determinado que es un compuesto de fórmula (II) donde P es HRP. La misma distribución de reactivos se repitió para cada placa con un anticuerpo diferente. La reacción
5 inmunológica 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

4.1. Respuesta inmune

10 Los cuatro inmunógenos produjeron respuestas inmunes semejantes y equivalentes, con títulos entorno a 10^5 (Figura 5).

4.1.1. Determinación de la afinidad de los anticuerpos

Cada uno de los anticuerpos obtenidos se ensayó frente a su antígeno de ensayo homólogo usando el ensayo de tipo ELISA competitivo, tanto en
15 formato de ensayo de antígeno inmovilizado con detección indirecta como en el formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa. Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno de ensayo frente a diferentes concentraciones de anticuerpo en ensayo competitivo utilizando como
20 competidor diferentes concentraciones de pirimetanil preparadas por dilución seriada. Solamente a partir de tres de los compuestos de fórmula (I) sintetizados, PMm6, PMp6, y PMb5, fue posible generar anticuerpos capaces de reconocer al pirimetanil con elevada afinidad. Este resultado confirma que dichas estructuras son idóneas para el objetivo que se persigue y demuestra la
25 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 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 antígeno inmovilizado con detección indirecta:

Tabla 1a

OVA-PMm6					
Anticuerpo	Conjugado ($\mu\text{g/mL}$)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMm6#1	0.1	300	0.58	0.64	12.99
	0.1	100	1.36	0.54	19.97
rPMm6#2	0.1	300	0.75	0.57	10.44
	0.1	100	1.59	0.60	19.44

Tabla 1b

OVA-PMp6					
Anticuerpo	Conjugado ($\mu\text{g/mL}$)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMp6#1	0.01	300	0.80	0.55	7.0
	0.1	100	1.12	0.56	14.2
rPMp6#2	0.01	1000	0.74	0.44	5.6
	0.1	300	1.09	0.57	22.6

5

Tabla 1c

OVA-PMb5					
Anticuerpo	Conjugado ($\mu\text{g/ml}$)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMb5#1	0.01	100	1.13	0.64	2.2
	0.1	300	1.30	0.57	5.3
rPMb5#2	0.01	100	0.92	0.57	3.0
	0.1	300	0.95	0.50	9.0

Tabla 1d

OVA-PMn5					
Anticuerpo	Conjugado ($\mu\text{g/mL}$)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMn5#1	0.01	300	1.13	0.64	57.7
	0.1	1000	0.69	---	---
rPMn5#2	0.01	1000	0.87	0.69	754.7
	0.1	1000	0.82	---	---

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

Tabla 2a

HRP-PMm6					
Anticuerpo	Trazador (ng/mL)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{\max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMm6#1	10	30	0.81	0.67	5.75
	10	10	1.30	1.00	7.32
rPMm6#2	30	3	0.59	0.43	194.65
	100	3	1.07	0.43	592.47

Tabla 2b

HRP-PMp6					
Anticuerpo	Trazador (ng/mL)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{\max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMp6#1	3	30	1.11	0.61	6.9
	10	30	1.50	0.72	14.8
rPMp6#2	1	30	1.98	0.60	58.6
	3	100	1.14	0.50	12.8

5

Tabla 2c

HRP-PMb5					
Anticuerpo	Trazador (ng/mL)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{\max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMb5#1	3	10	0.86	0.75	0.9
	10	30	0.65	0.84	1.9
rPMb5#2	3	3	0.62	0.80	1.1
	10	3	1.45	1.02	0.6

Tabla 2d

HRP-PMn5					
Anticuerpo	Trazador (ng/mL)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{\max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rPMn5#1	3	30	0.76	0.74	46.2
	10	30	1.97	0.79	63.1
rPMn5#2	3	30	0.78	0.63	144.0
	10	30	2.18	0.72	205.4

En la Figura 6 se muestran las curvas de inhibición obtenidas con el anticuerpo rPMp6#1 y el compuesto de fórmula (II) que es un antígeno de ensayo homólogo, tanto en formato de antígeno de ensayo inmovilizado con

10

detección indirecta como con el formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa. Para el ensayo indirecto los pocillos se tapizaron con 0.01 μg de compuesto de fórmula (II) que es un antígeno de ensayo y la dilución del anticuerpo en la etapa de competición fue de $1/10^5$. En el caso del ensayo con
5 formato directo, el pocillo se tapizó con 100 μL de una dilución del anticuerpo a $1/2 \times 10^4$ y en la etapa competitiva se usó 0.3 ng de trazador enzimático homólogo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):

T-L-Y

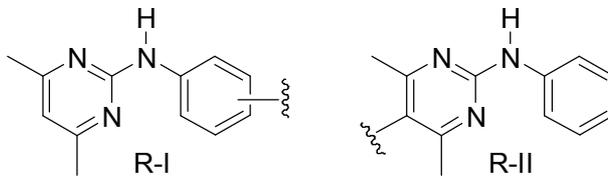
5

(I)

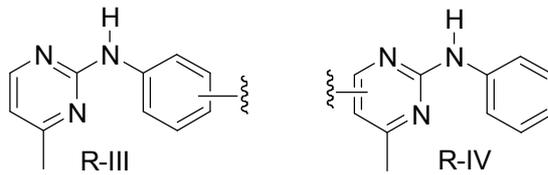
caracterizado porque

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

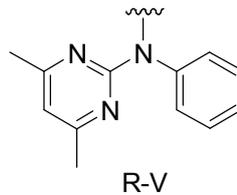
10



15



20



donde

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

25 **R-II** es [4,6-dimetil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo];

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

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

R-V es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada de 2 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, -NH₂, -N₃, -CH₂Br, -CH₂I, -CHO, -SH, -SO₃H, -OSO₂Ph, -NH-NH₂ y -OSO₂Ar;

con la condición de que:

- 10 a) cuando T es [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo], -L-Y es diferente de -CH₂CH₂-NH₂;
- b) cuando T es [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo], -L-Y es diferente de -CONHCH₂-CO₂H;
- c) cuando T es [4-((4-metilpirimidin-2-il)amino)fenilo], -L-Y es diferente de
15 -CHCH₃-CO₂H;
- d) cuando T es [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo], -L-Y es diferente de -OCH₂-CO₂H;
- e) cuando T es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino], L es una
20 cadena hidrocarbonada de 2 a 40 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada, con la condición de que dicha cadena hidrocarbonada no comprende ningún heteroátomo;
- f) cuando T es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino], -L-Y es diferente de -(CH₂)₃-NH₂.

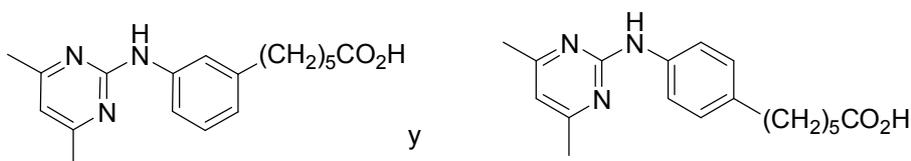
25 2. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono.

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, -NH₂ y -SH.

30 4. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque **T** es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo]

o [4-((4,6-dimetilpirimidin-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 $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$.

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



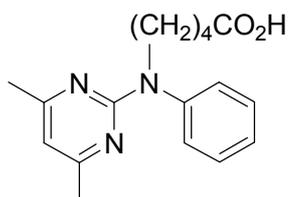
6. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque **T** es [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono; e **Y** se selecciona dentro del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$,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

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

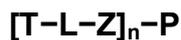


8. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque **T** es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 8 átomos de carbono; e **Y** se selecciona dentro del grupo que consiste en $-\text{COOH}$,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

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



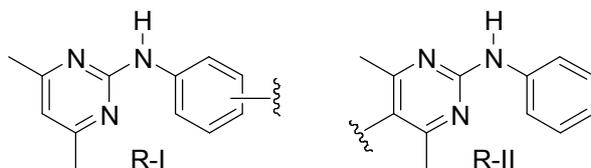
10. Un compuesto de fórmula (II):



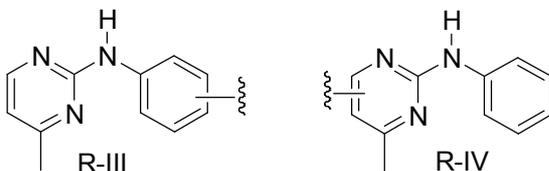
(II)

caracterizado porque

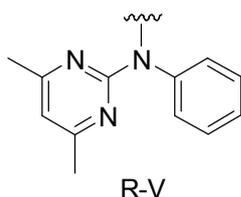
5 **T** se selecciona del grupo que consiste en **R-I**, **R-II**, **R-III**, **R-IV** y **R-V**;



10



15



donde

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

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

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

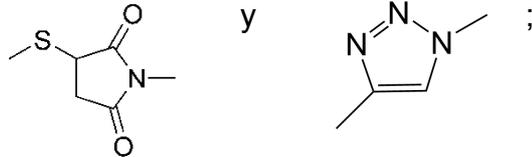
25 **R-IV** se selecciona del grupo que consiste en [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo]; y

R-V es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada de 2 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-,
5 -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -OCO-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH-, -NR-,

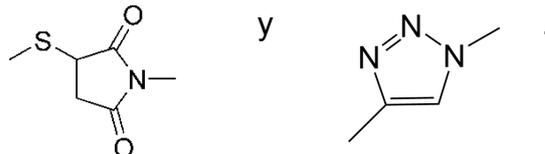


P es un polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor de 2000
10 daltons; y

n es un número con un valor entre 1 y 500.

11. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 10, caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono.

12. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones
15 10 o 11, caracterizado porque **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



13. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones
20 10 a 12, caracterizado porque **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

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

25 **T** es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 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, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

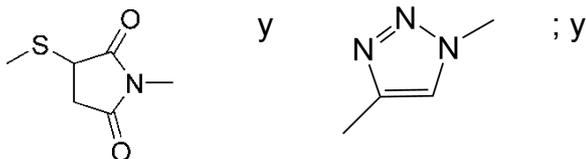
15. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 14, caracterizado porque **T** es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 5
 10 átomos de carbono; **Z** es $-\text{CONH}-$; **P** se selecciona del grupo que 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-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo];

- 15 **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 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, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

17. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 16, caracterizado porque **T** es [6-metil-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 [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 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, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

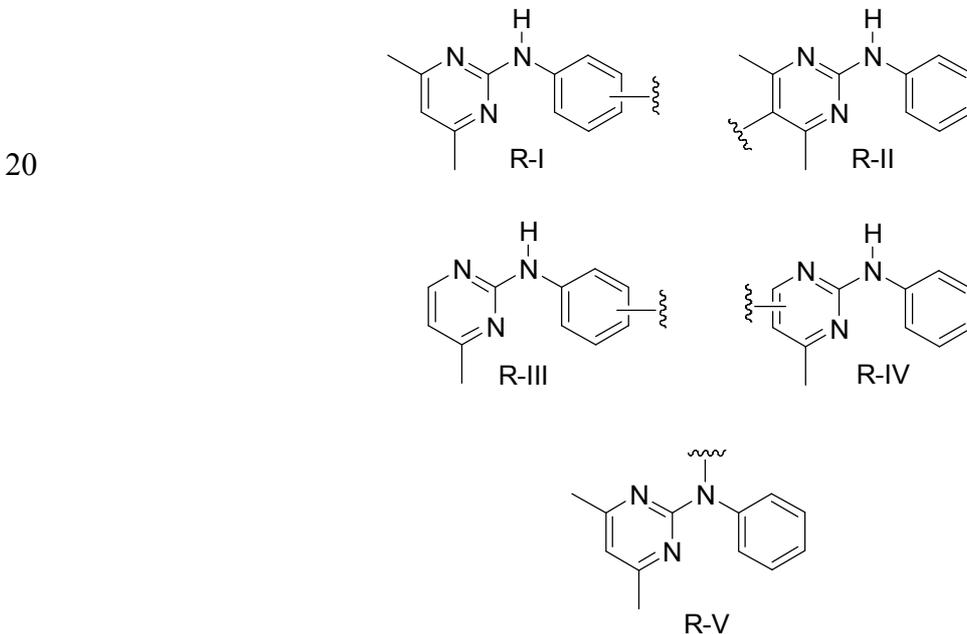
19. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 18, caracterizado porque **T** es [N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-N-(fenil)amino]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 átomos de carbono; **Z** es -CONH-; **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa; y **n** es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

20. Un compuesto de fórmula (III):



caracterizado porque

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



donde

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

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

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

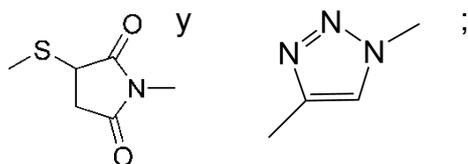
10 **R-IV** se selecciona del grupo que consiste en [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-4-ilo] y [6-metil-2-(fenilamino)pirimidin-5-ilo];y

R-V es [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

15 **L** es una cadena hidrocarbonada de 2 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-,

20

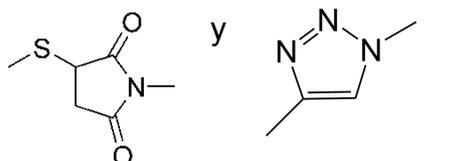


Q es un marcador no isotópico; y

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

21. Un compuesto de fórmula (III) según la reivindicación 20, caracterizado porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 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-,



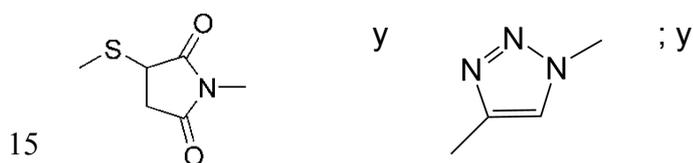
23. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizado porque **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo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

T es [3-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo] o [4-((4,6-dimetilpirimidin-2-il)amino)fenilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

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



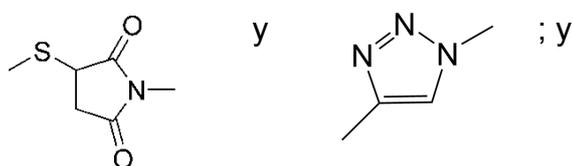
Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bpirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro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

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

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

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

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



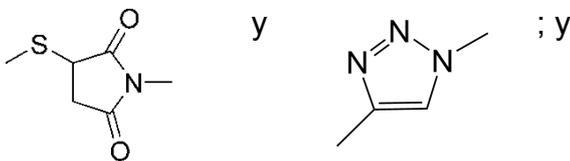
Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio y micro- o nanopartículas de oro 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 [*N*-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-*N*-(fenil)amino];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 20 átomos de carbono;

10 **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.

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 pirimetanil en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- a. poner en contacto la muestra con el anticuerpo descrito en la reivindicación 27;
- 25 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).

29. Método de análisis de pirimetanil 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 compuesto de fórmula (II) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19.

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

31. Kit de detección de pirimetanil, caracterizado porque comprende al menos un anticuerpo tal como se define en la reivindicación 27 y un compuesto
15 seleccionado del grupo que consiste en un compuesto de fórmula (II) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 y un compuesto de fórmula (III) tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26.

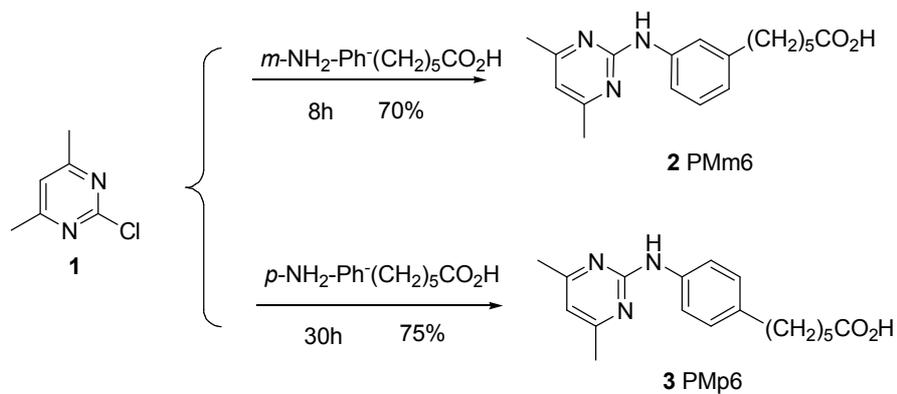


Fig. 1

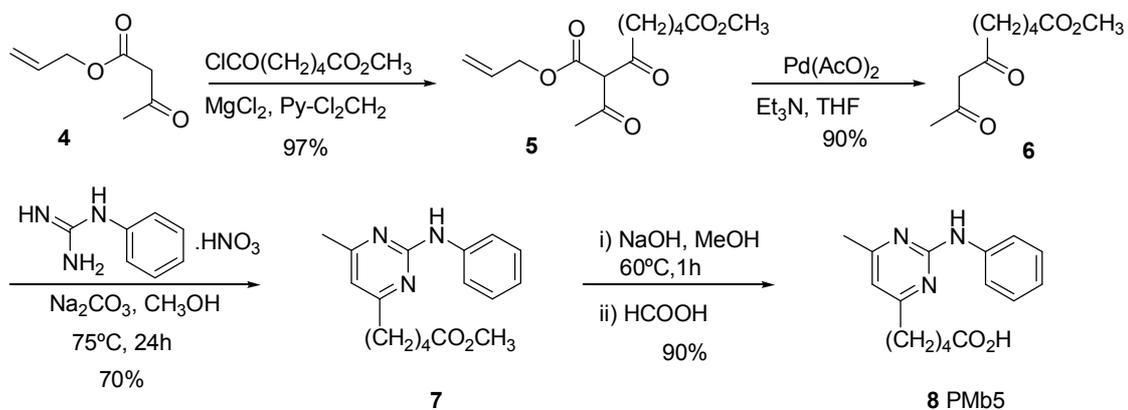


Fig. 2

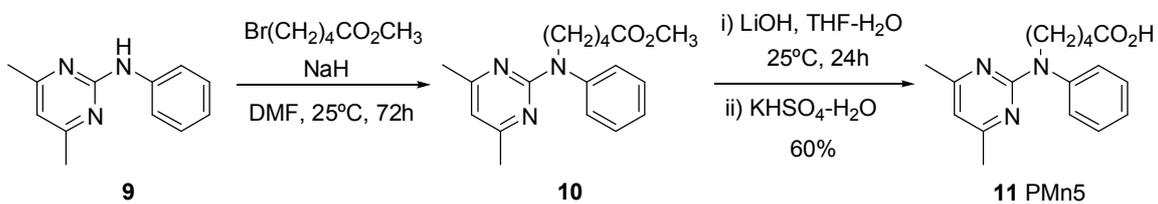


Fig. 3

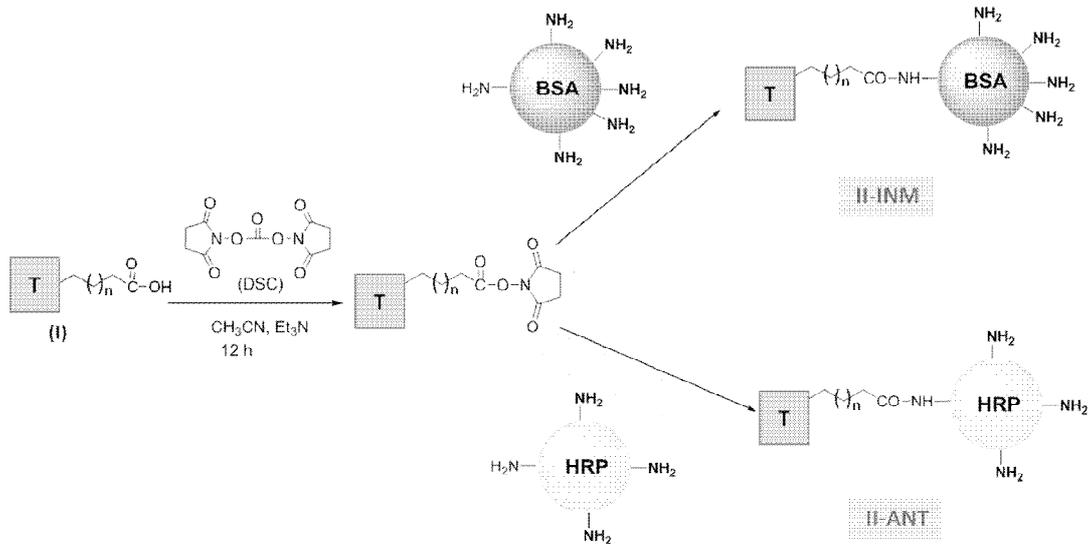


Fig. 4

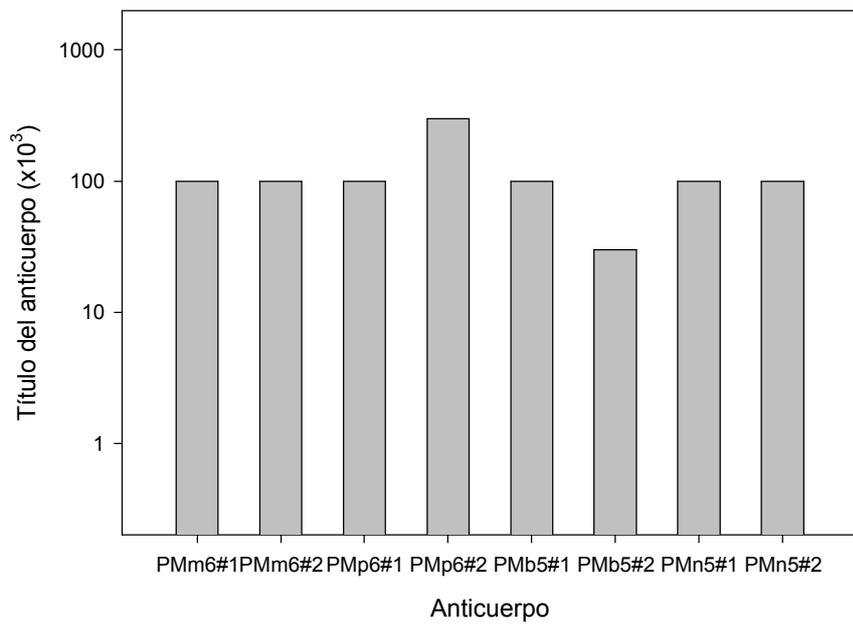


Fig. 5

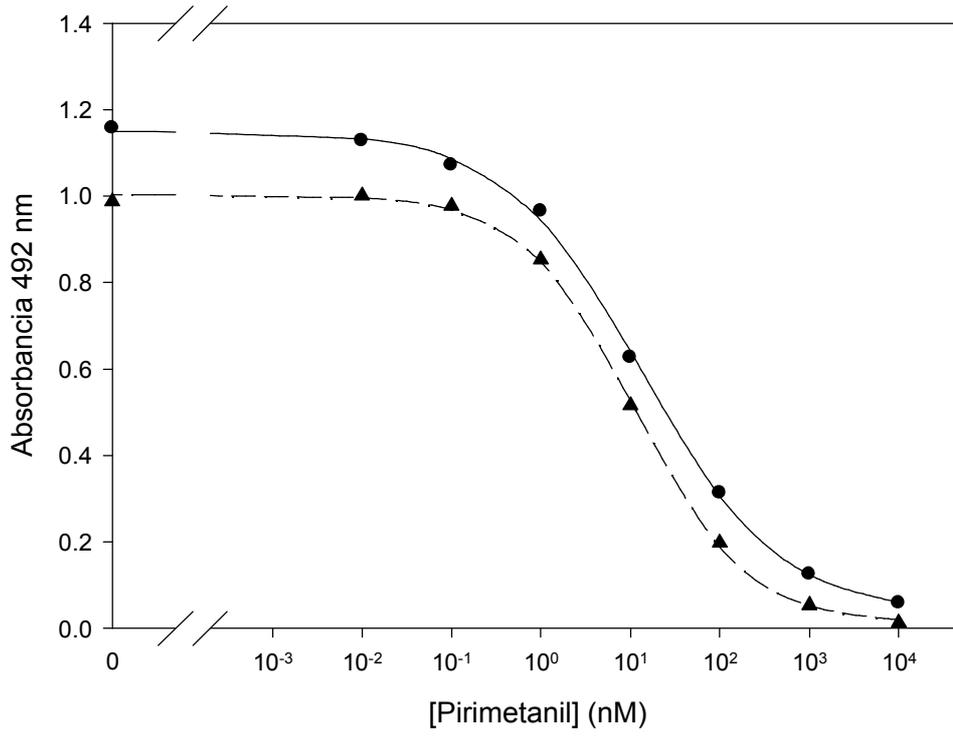


Fig. 6



- ②① N.º solicitud: 201230098
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.01.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KIM, H.-J. et al. "Automated flow fluorescent immunoassay for part per trillion detection of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam." Analytica Chimica Acta 2006, Volumen 571, páginas 66-73. [Disponible en línea el 05.05.2006]. Ver página 66, resumen; página 69, figura 2; página 67, parte experimental.	1-31
A	ARGARATE, N. et al. "Evaluation of Immunoassays as an Alternative for the Rapid Determination of Pesticides in Wine and Grape Samples." Journal of AOAC International 2010, Volumen 93, Número 1, páginas 2-11.	1-31
A	BAGGIANI, C. et al. "Molecularly imprinted solid-phase extraction method for the high performance liquid chromatographic analysis of fungicide pyrimethanil in wine". Journal of Chromatography A 2007, Volumen 1141, páginas 158-164. [Disponible en línea el 18.12.2006]. Ver página 158, resumen.	1-31
A	EP 0270111 A1 (KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY, CO., LTD. & IHARA CHEMICAL INDUSTRY, CO., LTD.) 03.12.1987, página 3, líneas 4-6; página 4, ejemplo (I); páginas 6-9, ejemplo 1.	1-31
A	US 6376548 A1 (MULVIHILL, M.J. & SHABER, S.H.) 23.04.2002, columna 1, líneas 3-10; columna 3, línea 27; columna 6, ejemplo (I).	1-31

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 29.05.2013</p>	<p>Examinador G. Esteban García</p>	<p>Página 1/4</p>
--	---	-----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

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)

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

C07K, C07D, G01N, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.05.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-31	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-31	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KIM, H.-J. et al. Analytica Chimica Acta 2006, Vol. 571, pp. 66-73.	05.05.2006
D02	ARGARATE, N. et al. Journal of AOAC International 2010, Vol. 93, Nº 1, pp. 2-11.	2010
D03	BAGGIANI, C. et al. Journal of Chromatography A 2007, Vol. 1141, pp. 158-164.	18.12.2006
D04	EP 0270111 A1	03.12.1987

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

El objeto de la invención es un compuesto de fórmula (I), que comprende un resto de fenilaminopirimidina; un compuesto de fórmula (II), derivado de (I) que incluye un polipéptido; un compuesto de fórmula (III), derivado de (I) que presenta un marcador no isotópico; un anticuerpo generado en respuesta a un compuesto de fórmula (II), un método de análisis *in vitro* de pirimetanil que utiliza dicho anticuerpo; y un kit de detección de pirimetanil que comprende el anticuerpo y un compuesto de fórmula (II) ó (III).

El documento D01 divulga un inmunoensayo fluorescente ultrasensible que permite el análisis cuantitativo del insecticida neonicotinoide **tiametoxano** (ver página 66, resumen). Para llevar a cabo el ensayo se prepararon el hapteno correspondiente, que presenta un grupo funcional ácido carboxílico (ver página 69, figura 2), los conjugados hapteno-BSA, que se inmovilizaron sobre PMMA, y los correspondientes anticuerpos monoclonales específicos para tiametoxano (ver página 67, parte experimental).

El documento D02 divulga una serie de ensayos inmunoquímicos para la detección de tres pesticidas (atrazina, bromopropilato y 2,4,6-triclorofenol) en muestras de vino, uvas y mosto (ver página 2, resumen).

Los documentos D01 y D02 utilizan una estrategia similar a la de la solicitud para la detección de un insecticida (tiametoxano), pero se diferencia en la naturaleza del compuesto sobre el que se aplica dicha estrategia, que en el caso de la solicitud es el fungicida pirimetanil.

El documento D03 divulga un método para la extracción en fase sólida de pirimetanil a partir de muestras de vino que utiliza un polímero de impresión molecular (ver página 158, resumen).

Este documento divulga un procedimiento cromatográfico para el análisis de pirimetanil que, a diferencia del procedimiento de la solicitud no incluye inmunoensayos. Los derivados de pirimetanilo obtenidos por impresión del polímero son también diferentes a los conjugados recogidos en la solicitud de patente.

El documento D04 divulga derivados de pirimidina de fórmula (I) que tienen actividad como fungicidas (ver página 3, líneas 4-6; página 4, fórmula (I)). En concreto, se divulgan numerosos compuestos que se encuentran sustituidos en el anillo pirimidínico, en el anillo bencénico y/o en el nitrógeno que los une (ver páginas 6-9, tabla 1).

Aunque estos compuestos contienen el mismo esqueleto fundamental del compuesto (I) de la invención, ninguno de ellos presenta los sustituyentes que aparecen en éste y que se recogen en la reivindicación 1.

Los documentos citados muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia un compuesto de fórmula (I) (reivindicación independiente 1); y, por tanto tampoco hacia un compuesto de fórmula (II), derivado de (I) que incluye un polipéptido (reivindicación independiente 10); un compuesto de fórmula (III), derivado de (I) que presenta un marcador no isotópico (reivindicación independiente 20); un anticuerpo generado en respuesta a un compuesto de fórmula (II) (reivindicación independiente 27); un método de análisis *in vitro* de pirimetanil que utiliza dicho anticuerpo (reivindicación independiente 28); y un kit de detección de pirimetanil que comprende el anticuerpo y un compuesto de fórmula (II) ó (III) (reivindicación independiente 31).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-31 reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.