

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 401**

21 Número de solicitud: 201031671

51 Int. Cl.:

C07D 213/82 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/534 (2006.01)

A01N 43/40 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **12.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.06.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES y
UNIVERSITAT DE VALENCIA**

72 Inventor/es:
**MERCADER BADIA, JOSEP VICENT;
ABAD FUENTES, ANTONIO;
ABAD SOMOVILLA, ANTONIO y
AGULLO BLANES, CONSUELO**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **DERIVADOS FUNCIONALIZADOS DE BOSCALID.**

57 Resumen:

Derivados funcionalizados de boscalid.

La presente invención se refiere a nuevos derivados funcionalizados químicamente de boscalid. Además la presente invención se refiere a inmunógenos de boscalid, a los derivados conjugados o marcados y a los anticuerpos que se obtienen a partir de los inmunógenos de la presente invención.

ES 2 382 401 A1

DESCRIPCIÓN

Derivados funcionalizados de boscalid.

La presente invención se refiere a nuevos derivados funcionalizados químicamente de boscalid. Además la presente invención se refiere a inmunógenos de boscalid, a los derivados conjugados o marcados y a los anticuerpos que se obtienen a partir de los inmunógenos de la presente invención.

ESTADO DE LA TÉCNICA

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

Entre los fungicidas más relevantes desarrollados en la última década con aplicaciones en postcosecha destaca el boscalid [H.J. Rosslenbroich y D. Stuebler, *Crop Protection* **2000**, *19*, 557–561]. El boscalid (2-cloro-N-(4-clorobifenil-2-il)nicotinamida) es un producto fitosanitario desarrollado por BASF y lanzado al mercado en la temporada 2003/2004. Se trata del único fungicida desarrollado hasta la fecha de la familia de las carboxamidas. En la actualidad ha sido ya registrado para combatir más de 80 enfermedades que afectan a más de 100 cultivos en aproximadamente 50 países. El boscalid ha sido incluido muy recientemente (2008) en el Anexo I de la directiva 91/414/EEC de la Unión Europea relativa a la introducción en el mercado de productos fitosanitarios. El boscalid combate a los hongos mediante la inhibición de la enzima succinato-ubiquinona reductasa, también conocida como complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Esta enzima, además de canalizar el transporte de electrones a través del cosustrato ubiquinol (QH₂), ocupa un lugar central en el metabolismo del hongo, ya que también cataliza la oxidación del succinato a fumarato como parte del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. De este modo, se bloquean al mismo tiempo tanto la producción de energía como la biosíntesis de los aminoácidos y lípidos esenciales para el desarrollo de las células fúngicas. Por tanto, el boscalid presenta una doble actividad, y resulta extraordinariamente eficaz frente a *Botrytis cinerea* y *Penicillium* spp. Entre los cultivos para los que la UE ha establecido Límites Máximos de Residuos de forma explícita para boscalid figuran la fruta de hueso y de pepita (2–3 ppm), uva y kiwi (5 ppm), fresa (10 ppm), patata (0.5 ppm), y tomate, pimiento y berenjena (1–3 ppm).

Las metodologías analíticas empleadas para el análisis de estos fungicidas son fundamentalmente de tipo instrumental, en especial cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a diferentes detectores según el tipo de compuesto a analizar y la sensibilidad requerida [J.L. Tadeo, *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, CRC Press, Boca Raton, **2008**]. 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 esta razón, 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 enzoinmunoensayos. Los primeros inmunoensayos enzimáticos para plaguicidas se desarrollaron durante la primera mitad de los años 80 [F. Jung et al., *Pest. Sci.* **1989**, *26*, 303–317]. 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 [V.S. Morozova et al., *J. Anal. Chem.* **2005**, *60*, 202–217]. 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

5 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 redonda 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].

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 Hasta la fecha no se han sintetizado derivados funcionalizados de boscalid ni existen anticuerpos contra dicho plaguicida. Los reactivos que se describen en la presente invención son los primeros derivados funcionalizados y conjugados de boscalid, producidos para la obtención de anticuerpos y el desarrollo de inmunoensayos contra este fungicida. En primer lugar, se describe la síntesis de haptenos funcionalizados de boscalid por diferentes posiciones. Con estos derivados se prepararon conjugados a proteínas transportadoras necesarias para la obtención de anticuerpos y la realización de inmunoensayos. Finalmente, se describen anticuerpos con elevada afinidad y selectivos de boscalid.

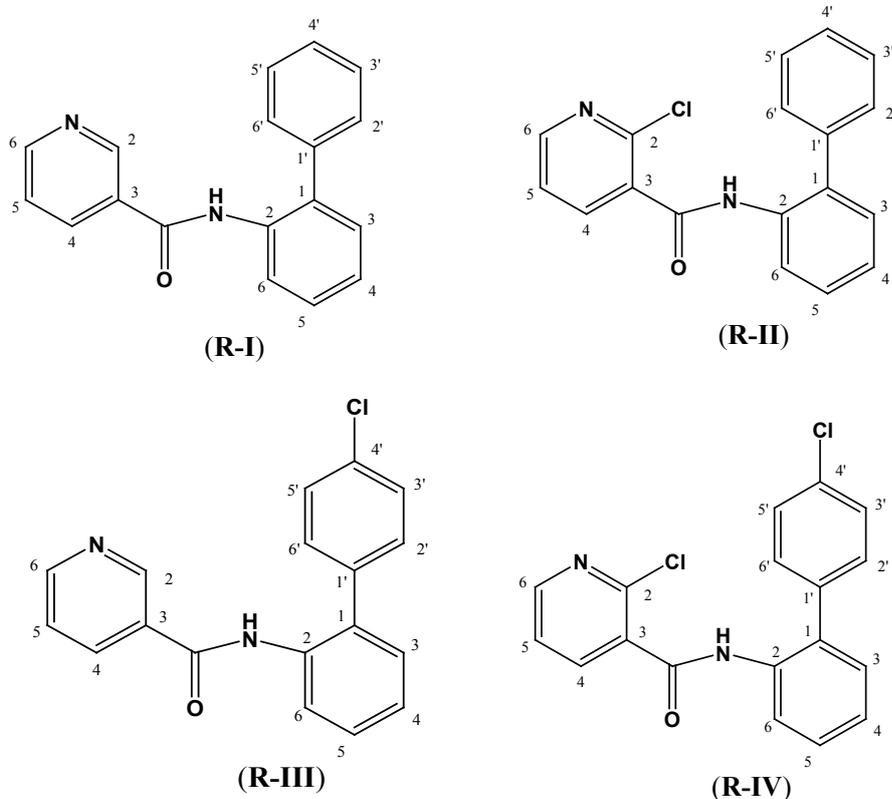
20 Un primer aspecto de la presente invención describe haptenos de boscalid funcionalizados para generar inmunógenos, conjugados y anticuerpos contra el boscalid. Dichos haptenos activados están representados por los compuestos de fórmula general (I):

B-X-L-Y

(I)

donde

25 **B** se selecciona entre un radical 2-(nicotinamido)bifenilo (**R-I**), un radical 2-(2-cloronicotinamido)bifenilo (**R-II**), un radical 4'-cloro-2-(nicotinamido)bifenilo (**R-III**) y un radical 4'-cloro-2-(2-cloronicotinamido)bifenilo (**R-IV**);



30 **X** puede estar presente o no y se selecciona entre O, S, NH y un átomo de carbono saturado o insaturado. La unión de **X** con los radicales **R-I** a **R-IV** se realiza por cualquiera de las posiciones que quedan libres en los mismos;

L representa un espaciador de 0 a 40 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal o en una cadena ramificada, saturada o insaturada, y que puede comprender hasta dos estructuras de anillo y entre 0 y 20 heteroátomos siendo los heteroátomos seleccionados entre S, O y N, con la condición de que no más de dos heteroátomos puedan unirse en secuencia;

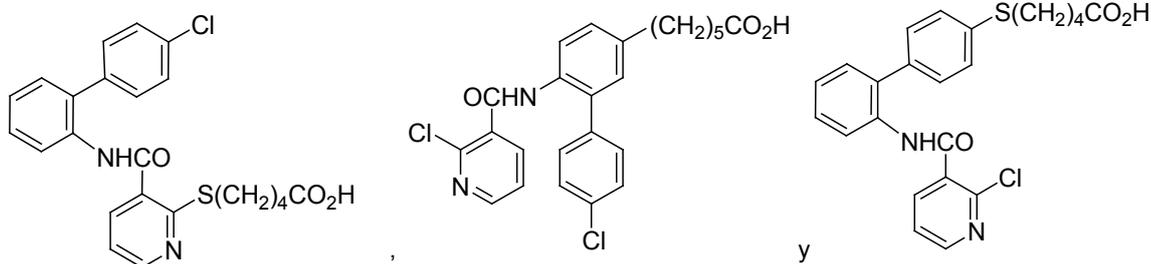
- 5 **Y** es un grupo funcional seleccionado entre -COOH, -OH, -NH₂, -NH-, -N₃, -CH₂Cl, -CHCl-, -CH₂Br, -CHBr-, -CH₂I, -CHI-, -CHO, -SH, -S-S-, -SO₃H, -SO₃Ar, -OSO₂Ph, -OSO₂Ar, -NH-NH₂ y -C(=N-NH₂)-

Según una realización preferida, **X** se selecciona entre S y un átomo de C saturado.

Según otra realización preferida, **L** representa un espaciador de 0 a 8 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal.

- 10 Según otra realización preferida, **Y** es un grupo funcional seleccionado entre -COOH, -CHO, -NH₂ y -SH.

Según otra realización preferida, los haptenos activados de boscalid se seleccionan entre:



Un segundo aspecto de la presente invención describe conjugados de boscalid de fórmula general (II):

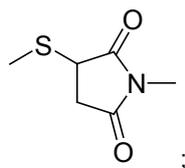
- 15
$$[B-X-L-Z]_n-P$$

(II)

donde

B, X y L se definen de la misma manera que anteriormente;

- 20 **Z** es un grupo funcional seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, -NHCONH-, -NHCSNH-, -OCONH-, -NHOCO-, -OCSNH-, -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH- y



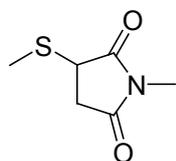
P se selecciona entre un péptido, un polipéptido, un polisacárido y un polímero sintético;

n es un número entero seleccionado entre 1 y 50 por cada 50 kilodaltons de peso molecular de **P**.

Según una realización preferida, **X** se selecciona entre S y un átomo de carbono saturado.

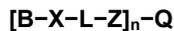
- 25 Según otra realización preferida, **L** representa un espaciador de 0 a 8 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal.

Según otra realización preferida, **Z** se selecciona entre un grupo -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S- y



- 30 Según otra realización preferida, **P** se selecciona de entre albúmina (de huevo o sérica), tiroglobulina, hemocianina, beta-galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa, y oxidasa.

Un tercer aspecto de la presente invención describe derivados marcados de fórmula general (III):



(III)

donde

5 **B, X, L y Z** se definen de la misma manera que anteriormente;

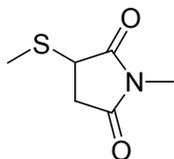
Q es un marcador químico isotópico o no isotópico, tal como ^{125}I , un fluoróforo, o una sustancia luminiscente, un marcador acoplado a un sistema de detección indirecta tal como la biotina, un mediador electroquímico, micro o nanopartículas u otros;

n es un número entero entre 1 y 50 por cada 50 kilodaltons de peso molecular de **Q**.

10 Según una realización preferida, **X** se selecciona entre S y un átomo de carbono saturado.

Según otra realización preferida, **L** representa un espaciador de 0 a 8 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal.

Según otra realización preferida, **Z** se selecciona entre un grupo $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{NH}-$, $-\text{S}-$ y



15 Según otra realización preferida, **Q** se selecciona entre biotina, fluoresceína y sus derivados, fluoróforos de cianinas (por ejemplo Cy-5), de rodaminas o de cumarinas, bipyridilos de rutenio, derivados de TEXAS RED y de BODIPY, luciferina y derivados, ésteres de acridinio, así como partículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

Un cuarto aspecto de la presente invención describe anticuerpos generados en respuesta al inmunógeno de fórmula general (II):



(II)

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método de detección de boscalid en una muestra aislada que consiste en:

- a. poner en contacto una muestra aislada con el anticuerpo descrito anteriormente;
- 25 b. incubar la muestra aislada 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).

Según una realización preferida, la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso c se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, por ejemplo de tipo ELISA.

30 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un kit de detección de boscalid que utiliza los anticuerpos descritos anteriormente.

El término analito se refiere a una sustancia o grupo de sustancias cuya presencia o concentración se quiere determinar en la muestra.

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

El término antígeno en esta memoria se refiere a una molécula capaz de interactuar específicamente con un anticuerpo. La interacción o reacción inmunoquímica consiste en la unión no covalente entre un anticuerpo y un antígeno.

40 Los haptenos son antígenos parciales o incompletos. Son sustancias libres de proteínas, mayoritariamente sustancias de bajo peso molecular que no son capaces de estimular la formación de anticuerpos, pero que

reaccionan con los mismos. Los anticuerpos contra haptenos se forman mediante acoplamiento del hapteno con un portador de elevado peso molecular e inyectando este producto acoplado o conjugado en seres humanos o en animales. Entre los ejemplos de haptenos se incluyen fármacos terapéuticos tales como digoxina y teofilina, antibióticos tales como gentamicina y vancomicina, hormonas tales como estrógeno y progesterona, micotoxinas tales como aflatoxina y ocratoxina, plaguicidas como clorpirifos, azoxistrobin y fenhexamid, etc.

El término espaciador se refiere a un grupo químico que conecta un hapteno a un portador, inmunógeno, marcador, trazador o a otro espaciador. Los espaciadores pueden ser cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o insaturadas. También pueden incluir uno o más heteroátomos dentro de la cadena o en los extremos de las cadenas. El término heteroátomo se refiere a átomos diferentes del carbono que se seleccionan entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. La utilización de un espaciador puede resultar o no ventajosa o necesaria, dependiendo de las parejas específicas de hapteno y portador.

La expresión hapteno activado se refiere a un derivado de hapteno al que se ha introducido un grupo químico capaz de reaccionar, para que mediante la reacción, o provisión de un grupo activo, poder sintetizar un conjugado del hapteno o su marcaje.

El término portador, tal como se utiliza en la presente invención, es una sustancia polimérica, comúnmente una proteína, que puede unirse con un hapteno. Entre las sustancias portadoras se incluyen péptidos, proteínas, glucoproteínas, polisacáridos complejos y ácidos nucleicos.

Los términos inmunógeno e inmunogénico tal como se utilizan en la presente invención se refieren a sustancias que son reconocidos como extraños al organismo vivo y por lo tanto son capaces de producir o de generar una respuesta inmune en un huésped.

Los términos conjugado y derivado se refieren a un compuesto o molécula química preparada a partir de un compuesto o molécula parental mediante una o más reacciones químicas.

Tal como se utiliza en la presente invención, una molécula detectora, marcadora o trazadora es una etiqueta identificadora que, unida a una sustancia o molécula portadora, puede utilizarse para detectar un analito. El marcador puede unirse a la sustancia portadora del mismo directa o indirectamente mediante un grupo enlazante o puente. Entre los ejemplos de marcadores se incluyen enzimas tales como la beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa, compuestos fluorescentes tales como rodamina e isotiocianato de fluoresceína (FITC), compuestos luminiscentes tal como luciferina e isótopos radioactivos tales como ¹²⁵I.

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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de la síntesis del hapteno BLA5.

Figura 2. Esquema de la síntesis del hapteno BLb6.

Figura 3. Esquema de la síntesis del hapteno BLC5.

Figura 4. Título de los antisueros anti-boscalid determinado en ensayo homólogo con 0.01 µg de conjugado antigénico inmovilizado.

Figura 5. Curvas estándar para boscalid en diferentes formatos de ELISA competitivo.

EJEMPLOS

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 (I) como haptenos para la obtención de anticuerpos anti-boscalid. Los números en negrita hacen referencia a la correspondiente estructura que se muestra en los esquemas de las figuras 1 a 3. Estos ejemplos se presentan a modo de demostración pero de ningún modo pueden suponer un límite a la invención.

1) Síntesis de haptenos

a) Síntesis del hapteno BLA5 (7):

Este hapteno se obtiene en dos etapas a partir de ácido comercial 2-mercaptocotínico (**1**). Así, la reacción de **1** con el ácido 5-bromopentanoico (**2**) en hidróxido potásico acuoso proporciona el ácido dicarboxílico **3** [A. Da Settimo et al., *J. Heterocyclic Chem.* **2000**, *37*, 379–382], cuyo grupo carboxílico libre se protege quimioselectivamente como su

éster metílico por tratamiento con 2,2-dimethoxypropano en presencia de una cantidad catalítica de HCl anhidro, generado in situ a partir de TMSCl [A. Rodríguez et al., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8563–8566], para obtener el éster metílico intermedio **4** con un rendimiento global para las dos etapas de aproximadamente el 76%. Con el compuesto **4** disponible, la síntesis del hapteno BLA5 se completó de la siguiente forma. Primero, el grupo carboxílico se transformó en el correspondiente cloruro de ácido **5**, que fue subsecuentemente acoplado a 4'-clorobifenil-2-amina (**11**) [preparada en dos etapas con rendimiento global elevado a partir de 1-iodo-2-nitrobenceno (**8**) y el ácido clorofenilborónico (**9**), para proporcionar el éster metílico del hapteno BLA5 (**7**) con un rendimiento global excelente (91%). Finalmente, la hidrólisis promovida por base del éster metílico de **6** proporcionó el hapteno BLA5 (**7**) con un rendimiento del 89% después de la correspondiente purificación cromatográfica.

Preparación del ácido 2-(4-carboxibutiltio)nicotínico (3). Una disolución de la sal sódica del ácido 5-bromopentanoico en H₂O, preparada a partir del ácido (700.1 mg, 3.89 mmol) y NaHCO₃ (326.7 mg, 3.89 mmol) en 3 mL de H₂O, se añadió gota a gota sobre una disolución del ácido 2-mercaptotnicotínico (**1**) (500 mg, 3.23 mmol) en KOH acuoso al 10% (5 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a 60 °C por 4 h, se enfrió en un baño de hielo y se acidificó con HCl concentrado hasta pH 2–3. El producto sólido precipitado se recogió por filtración a vacío, se lavó con agua y se secó a vacío para proporcionar el diácido puro **3** (735.4 mg, 89%) como un sólido blanco. Pf. 145–148 °C (cristalizado de C₆H₆-MeOH); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.60 (1H, dd, *J* = 4.6, 1.8 Hz, H-6 Py), 8.18 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, H-4 Py), 7.21 (1H, dd, *J* = 7.6, 4.6 Hz, H-5 Py), 3.09 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H-1), 2.26 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-4), 1.62 (4H, m, H-2 y H-3); HRMS (EI), calculado para C₁₁H₁₃NO₄S 255.05603, encontrado 255.05661.

Preparación del ácido 2-(5-metoxi-5-oxopentiltio)nicotínico (4). Cloruro de trimetilsililo (20 μ L, 0.158 mmol) se añadió a una disolución agitada de MeOH anhidro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una semana, tras lo cual se vertió en agua y se procesó usando acetato de etilo para extraer. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron para dar el éster metílico **4** (338 mg, 85%) como un sólido blanco. Pf. 102–103 °C (cristalizado de C₆H₆); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (1H, dd, *J* = 4.6, 1.8 Hz, H-6), 8.31 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, H-4), 7.08 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, H-5), 3.67 (3H, s, CO₂Me), 3.21 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-1), 2.38 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-4), 1.80 (4H, m, H-2 y H-3); HRMS (EI), calculado para C₁₂H₁₅NO₄S 269.07218, encontrado 269.07342.

Preparación de la 4'-clorobifenil-2-amina (11):

i) 4'-cloro-2-nitrobifenilo (10). Pd(Ph₃)₄ (50.4 mg, 0.0436 mmol) se añadió bajo nitrógeno a una mezcla del ácido 4-(clorofenil)borónico (**9**) (170.4 mg, 1.09 mmol), 1-iodo-2-nitrobenceno (**8**) (226.1 mg, 0.9 mmol) y K₃PO₄ (577.9 mg, 2.72 mmol) en dioxano (4.5 mL) y H₂O (0.91 mL). La mezcla se agitó a 85 °C por 48 h, se vertió sobre agua y se extrajo con éter. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron. Purificación cromatográfica del crudo obtenido con gel de sílice, usando hexano-AcOEt 9:1 como eluyente, proporcionó el bifenilo **10** (229.4 mg, 90%) como un sólido amarillo. Pf. 60–62 °C (cristalizado de MeOH) [61 °C según C. Shih et al., *J. Chem. Soc.* **1958**, 1885–1889]. Los datos espectroscópicos de **10** fueron idénticos a los descritos en la literatura para el 4'-cloro-2-nitrobifenilo.

ii) 4'-clorobifenil-2-amina (11). Una disolución del nitro-bifenilo **10** (192 mg, 0.82 mmol) en 95% EtOH (3.2 mL) se añadió sobre una mezcla de NH₄Cl (21.9 mg, 0.41 mmol) en agua (1 mL) y hierro en polvo (195 mg, 3.49 mmol). La mezcla se refluó con agitación durante 1 h y se filtró para separar los sólidos. El filtrado se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Tras la correspondiente purificación cromatográfica sobre gel de sílice, usando hexano-AcOEt 8:2 como eluyente, se obtuvo el amino-bifenilo **11** (151 mg, 90%) como un semisólido incoloro [41–42 °C según C.K. Bradsher et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 404–405]. Los datos espectroscópicos de **11** coinciden totalmente con los descritos en la literatura para el 4'-cloro-2-aminobifenilo.

Preparación del 5-(3-(4'-clorobifenil-2-ilcarbamoyl)piridin-2-iltio)pentanoato de metilo (6). Cloruro de oxalilo (35.8 μ L, 0.715 mmol) se añadió gota a gota sobre una disolución agitada del ácido **4** (175 mg, 0.65 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (4 mL) seguido de una cantidad catalítica de DMF (16 μ L). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 24 h y el disolvente y exceso de reactivo se eliminaron a presión reducida. Se añadió benceno seco (10 mL) y se repitió la destilación, obteniéndose después de secar a vacío el 5-(3-(clorocarbonil)piridin-2-iltio)pentanoato de metilo (**5**) (186.8 mg) que fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación posterior.

Una mezcla del cloruro anterior, 4'-clorobifenil-2-amina (**11**) (100 mg, 0.488 mmol), piridina (52.6 μ L, 0.65 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP (1.61 mg) en CH₂Cl₂ anhidro (8 mL) se agitó a temperatura ambiente durante tres días. Después de este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con AcOEt. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo obtenido tras la evaporación del disolvente se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con mezclas de hexano-AcOEt (desde 9:1 a 6:4) para proporcionar la amida **6** (202 mg, 91%) como un sólido blanco. Pf. 105–107 °C (cristalizado de hexano-C₆H₆); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (1H, dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, H-6 Py), 8.41 (1H, br d, *J* = 8.1 Hz, H-3 PhPh), 8.12 (1H, br s, NH), 7.79 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, H-4 Py), 7.44–7.22 (7H, m, H-2'/H-6', H-3'/H-5', H-4, H-5 y H-6 PhPh), 7.04 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.8 Hz, H-5 Py), 3.66 (3H, s, CO₂Me), 3.14 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, H-5), 2.36 (2H, t, *J* =

7.2 Hz, H-2), 1.68 (4H, m, H-3 y H-4); HRMS (EI), calculado para $C_{24}H_{23}^{35}ClN_2O_3S$ 454.11179, encontrado 454.11181.

Preparación del ácido 5-(3-(4'-clorobifenil-2-ilcarbamoyl)piridin-2-iltio)pentanoico (7, Hapteno BLa5). Una disolución del éster metílico **6** (112 mg, 0.246 mmol) en MeOH (5.1 mL) y 2M NaOH (1.23 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4h. La mayor parte del disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se diluyó con agua (2 mL) y se acidificó con ácido fórmico. El precipitado blanco formado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó a vacío para dar el hapteno BLa5 (**7**) (97 mg, 89%) como un sólido blanco. Pf. 172–175 °C (cristalizado de MeOH frío); 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) \square 12.05 (1H, br s, COOH), 10.03 (1H, br s, NH), 8.50 (1H, dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, H-6 Py), 7.67 (1H, br d, $J = 6.9$ Hz, H-3 PhPh), 3.39–7.35 (9H, m, H-2'/H-6', H-3'/H-5', H-4, H-5 y H-6 PhPh), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 4.8$ Hz, H-5 Py), 3.10 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-5), 2.25 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, H-2), 1.61 (4H, m, H-3 y H-4); HRMS (EI), calculado para $C_{23}H_{21}^{35}ClN_2O_3S$ 440.09614, encontrado 440.09463.

b) Síntesis del hapteno BLb6 (**21**):

La síntesis del hapteno BLb6 (Figura 2) requiere la preparación previa del sintón correspondiente a la agrupación bifenilo, el compuesto **18**. Tal como se recoge la síntesis del compuesto **18** se inicia a partir del 2,4-diiodo-1-nitrobenceno (**13**), fácilmente obtenible a partir de 1,3-diiodobenceno (**12**) a través de una reacción de nitración con nítrico fumante [Z. Zhang et al., *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4339–4342], y se hace uso de la diferente reactividad de las dos posiciones iodadas frente a los procesos de acoplamiento cruzado catalizados por paladio. En primer lugar, se introduce la cadena C6 que constituye el brazo espaciador en la posición apropiada del sistema de biarilo a través de un acoplamiento regioselectivo de Sonogashira de la posición C4-iodada, la más reactiva en este tipo de acoplamiento, con 5-hexinoato de *terc*-butilo (**14**) [preparado según G. Bartoli et al., *Synthesis* **2007**, 3489–3496]. Esta reacción de acoplamiento catalizada por paladio proporciona el iodo-alquino **15**, el cual es transformado en el bifenilo **16**, a través de una reacción de de acoplamiento cruzado con el ácido 4-clorofenilborónico (**9**), con un rendimiento global moderado (50%). La reducción del triple enlace y del grupo nitro de **16**, necesarias para completar la preparación del intermedio clave **18**, se lleva a cabo de modo muy eficaz en dos etapas consecutivas. Así, hidrogenación del triple enlace acetilénico, usando el catalizador de Wilkinson, seguido de reducción del grupo nitro con hierro en condiciones ácidas muy suaves proporciona la bifenilamina **18** con un rendimiento global excelente (94%). Una vez completada la preparación de este intermedio clave, la síntesis del hapteno BLb6 (**21**) se completa eficazmente a través del acoplamiento del mismo con el cloruro del ácido 2-cloronicotínico (**19**) y subsecuente hidrólisis ácida del grupo éster *terc*-butílico.

Preparación del 2,4-diiodo-1-nitrobenceno (13). 1,3-Diiodobenceno (**12**) (2.15 g, 6.55 mmol) se añadió en pequeñas porciones a HNO_3 fumante (10 mL) enfriado a 0 °C. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 15 min a la misma temperatura y se vertió cuidadosamente en agua, extrayéndose a continuación con CH_2Cl_2 . Los extractos orgánicos se lavaron sucesivamente con disolución acuosa saturada de $NaHCO_3$, disolución acuosa de $NaHSO_3$ al 5% y salmuera. El secado sobre $MgSO_4$ anhidro y posterior eliminación del disolvente proporcionó un sólido amarillo que fue purificado por cromatografía sobre gel de sílice, usando hexano–AcOEt 95:5 como eluyente, para dar el derivado nitrado **13** (2.36 g, 94%) como un sólido amarillo cristalino. Pf. 95–97 °C (cristalizado de hexano) [93–95 °C según C. Álvarez-Toledano et al., *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2000**, *164*, 85–89]. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) \square B.43 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-3), 7.82 (1H, dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, H-5), 7.60 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6); HRMS (EI), calculado para $C_6H_3I_2NO_2$ 374.82533, encontrado 374.82459.

Preparación del 6-(3-iodo-4-nitrofenil)hex-5-inoato de terc-butilo (15). Una disolución de 5-hexinoato de *terc*-butilo (**14**) (295 mg, 1.75 mmol) en DMF anhidra desgasificada (4 mL) se añadió bajo nitrógeno sobre una mezcla del diioduro **13** (438 mg, 1.17 mol), CuI (2.2 mg, 0.01 mmol) y $(Ph_3P)_2PdCl_2$ (24.6 mg, 0.03 mmol). A continuación se añadió Et_3N seca (3.1 mL) y la mezcla de reacción, inicialmente amarilla y que se tornó naranja intenso después de unos pocos minutos, se agitó a temperatura ambiente durante 22 h. La mezcla de reacción se transfirió a un matraz de fondo redondo para la evaporación de la Et_3N en un evaporador rotativo, el residuo se disolvió en AcOEt, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró. Cromatografía del producto crudo obtenido, usando hexano–AcOEt 8:2 como eluyente, proporcionó el aril-alquino **15** (282 mg, 59%) como un aceite amarillo. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) \square B.05 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2 Ph), 7.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5 Ph), 7.44 (1H, dd, $J = 8.4, 1.7$ Hz, H-6 Ph), 2.49 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-4), 2.39 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 1.89 (2H, quint, $J = 7.2$ Hz, H-3), 1.45 (9H, s, Me); HRMS (EI), calculado para $C_{16}H_{18}INdeO_4$ 415.02806, encontrado 415.02812.

Preparación del 6-(4'-cloro-6-nitrobifenil-3-il)hex-5-inoato de terc-butilo (16). Una mezcla del ioduro de arilo **15** (238 mg, 0.56 mmol), ácido 4-clorofenilborónico (**9**) (107.4 mg, 0.68 mmol), K_3PO_4 (364 mg, 1.72 mmol) y $Pd(PPh_3)_4$ (26.4 mg, 0.024 mmol) en previamente desgasificados dioxano (2.9 mL) y agua (0.6 mL) se agitó a 85 °C por 20 h bajo nitrógeno. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. Los extractos se lavaron con agua, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se concentraron. Cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con hexano–AcOEt 98:2, proporcionó el biarilo **16** (190 mg, 83%) como un aceite amarillo. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) \square 7.84 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5 PhPh), 7.47 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-4 PhPh), 7.40 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2 PhPh), 7.40 (2H, m, H-2'/H-6' PhPh), 7.23 (2H, m, H-3'/H-5' PhPh), 2.50 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-4), 2.39 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 1.90 (2H, quint, $J = 7.1$ Hz, H-3), 1.45 (9H, s, CMe_3); HRMS (FAB), calculado para $C_{22}H_{23}^{35}ClNO_4$ ($M^+ + 1$) 400.13156, encontrado 400.13013.

Preparación del 6-(4'-cloro-6-nitrobifenil-3-il)hexanoato de *terc*-butilo (**17**). Una disolución del alquino **16** (166.8 mg, 0.42 mmol) y del catalizador de Wilkinson (12 mg, 0.013 mmol, 3%) en THF (2.7 mL) se purgó con atmósfera de hidrógeno gas. La presión de hidrógeno se reguló a 4 atm y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 18 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía, eluyendo con hexano-AcOEt 95:5, para dar el compuesto **17** (159.4 mg, 95%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5 PhPh), 7.40 (2H, H-2'/H-6' PhPh), 7.30 (1H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, H-4 PhPh), 7.25 (2H, m, H-3'/H-5' PhPh), 7.19 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2 PhPh), 2.72 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-6), 2.22 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2), 1.66 (4H, m, H-3 y H-5), 1.42 (9H, s, CMe_3), 1.37 (2H, m, H-4); HRMS (ES), calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}^{35}\text{ClNNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 426.1448, encontrado 426.1454.

Preparación del 6-(6-amino-4'-clorobifenil-3-il)hexanoato de *terc*-butilo (**18**). Una disolución de nitro-bifenil **17** (164 mg, 0.40 mmol) en 95% EtOH (2.6 mL) se añadió sobre una mezcla de NH_4Cl (17 mg, 0.32 mmol) y hierro en polvo en agua (0.8 mL) (108.6 mg, 1.94 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 1 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró para separar los sólidos. El filtrado se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. Los extractos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentraron para proporcionar amino-bifenilo **18** (149 mg, 98%) como un semisólido, que por espectroscopia de RMN mostró una pureza muy elevada y se utilizó en la siguiente etapa sin posterior purificación. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.40 (4H, br s, H-2'/H-6' y H-3'/H-5' PhPh), 6.97 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-4 PhPh), 6.91 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2 PhPh), 6.71 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5 PhPh), 2.54 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-2), 2.22 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 1.62 (4H, m, H-3 y H-5), 1.44 (9H, s, CMe_3), 1.38 (2H, m, H-4); HRMS (EI), calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}^{35}\text{ClNO}_2$ 373.18086, encontrado 373.17950.

Preparación del 6-(4'-cloro-6-(2-cloronicotinamido)bifenil-3-il)hexanoato de *terc*-butilo (**20**). Una disolución del amino-bifenilo **18** (67 mg, 0.18 mmol) y cloruro de nicotinoilo (**19**) (34.7 mg, 0.20 mmol) en THF anhidro (360 μL) se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Después de este tiempo el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía, eluyendo con CHCl_3 -hexano 1:1, para dar la amida **20** (87 mg, 95%) como un aceite viscoso. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.44 (1H, dd, $J = 4.7, 1.9$ Hz, H-6 Py), 8.26 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5 PhPh), 8.12 (1H, dd, $J = 7.8, 1.9$ Hz, H-4 Py), 8.06 (1H, s, NH), 7.44-7.30 (5H, m, H-2'/H-6', H-3'/H-5' y H-5 Py), 7.26 (1H, dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, H-4 PhPh), 7.07 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2 PhPh), 2.64 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-6), 2.21 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2), 1.63 (4H, m, H-3 y H-5), 1.43 (9H, s, CMe_3), 1.32 (2H, m, H-4); HRMS (EI), calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{30}^{35}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 512.16335, encontrado 512.16444.

Preparación del ácido 6-(4'-cloro-6-(2-cloronicotinamido)bifenil-3-il)hexanoico (**21**, Hapteno BLb6). Una disolución del éster *terc*-butílico **20** (68 mg, 0.13 mmol) en HCOOH (2.7 mL) se agitó a temperatura ambiente por 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con benceno y se lavó con agua y salmuera, se seco sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad, obteniéndose el hapteno BLb6 (**21**) (58 mg, 99%) como un sólido blanco. Pf. 137-139 $^\circ\text{C}$ (cristalizado de hexano-AcOEt); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (1H, dd, $J = 4.7, 1.9$ Hz, H-6 Py), 8.13 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5 PhPh), 8.01 (1H, dd, $J = 7.6, 2.0$ Hz, H-4 Py), 8.00 (1H, s, NH), 7.35-7.12 (5H, m, H-2'/H-6', H-3'/H-5' y H-5 Py), 7.15 (1H, dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, H-4 PhPh), 6.98 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2 PhPh), 2.55 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 2.25 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 1.57 (4H, m, H-3 y H-5), 1.32 (2H, m, H-4); HRMS (EI), calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{22}^{35}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 456.10075, encontrado 456.10005.

c) Síntesis del hapteno BLc5 (**29**):

La síntesis del hapteno BLc5 (Figura 3), en el que el brazo espaciador ocupa la posición C-4' de la agrupación bifenilo del boscalid, requiere la preparación previa del intermedio 2-amino-bifenilo (**27**). La síntesis de este intermedio se inicia en el producto comercial ácido 4-mercaptofenilborónico (**22**). Inicialmente este ácido se transforma en el correspondiente éster de etilenglicol (**23**). Esta transformación se lleva a cabo por tratamiento del ácido borónico con etilenglicol en condiciones ácidas muy suaves. La posterior alquilación de **23** con el 5-bromopentanoato de *terc*-butilo (**24**) [el compuesto 24 se preparó según J.V. Mercader et al., *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7682-7690] en medio básico seguido de cromatografía sobre gel de sílice, que produce la rápida hidrólisis del éster borónico formado inicialmente, conduce a la formación del ácido borónico **25** con un rendimiento global del 85%. La síntesis del sistema de bifenilo requerido se completa eficazmente a través de un acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura con el 1-iodo-2-nitrobenceno (**8**) para obtener el derivado de 2-nitrobifenilo (**26**), que es posteriormente transformado en la bifenilamina **27** en condiciones reductoras. Las últimas etapas para la preparación del hapteno BLc5 (**29**) son relativamente sencillas e implican la formación del enlace amida por reacción entre **27** y el cloruro del ácido 2-cloronicotínico (**19**) seguido por hidrólisis de la agrupación éster *terc*-butílico con ácido fórmico. El rendimiento global de las dos últimas etapas es del 85%.

Preparación del ácido 4-(5-*terc*-butoxi-5-oxopentiltio)fenilborónico (**25**). Una mezcla del ácido borónico **22** (152 mg, 0.99 mmol), etilenglicol (62 mg, 1 mmol) y MgSO_4 anhidro (240 mg) en Et_2O seco (4 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se filtro y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener el éster borónico **23** (168 mg, 93%) como un sólido blanco que mostró ser puro por espectroscopia de RMN de ^1H . $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3'/H-5'), 7.26 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2'/H-6'), 4.36 (4H, s, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

Una mezcla del boronato obtenido arriba (168 mg, 0.93 mmol), K_2CO_3 (193.5 mg, 1.4 mmol), NaI (40 mg, 0.27 mmol) y 5-bromopentanoato de *terc*-butilo (**24**) (332 mg, 1.4 mmol) en CH_3CN seco (3.4 mL) se agitó a temperatura ambiente por 5h. La mezcla de reacción se diluyó con Et_2O , se lavó con salmuera y se secó sobre $MgSO_4$ anhidro. La evaporación del disolvente a vacío dejó un residuo que se adsorbió sobre la cabeza de una columna de gel de sílice. Elución de la misma con $CHCl_3$ proporcionó el ácido alquiltioaril borónico **25** (267 mg, 85%) como un sólido amorfo. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2/H-6 Ph), 7.37 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3/ H-5 Ph), 3.02 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-1), 2.26 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-4), 1.76 (4H, m, H-2 y H-3), 1.43 (9H, s, CMe_3).

Preparación del 5-(2'-nitrobifenil-4-iltio)pentanoato de terc-butilo (26). $Pd(PPh_3)_4$ (18 mg, 0.015 mmol) se añadió bajo nitrógeno a una mezcla del ácido borónico **25** (123 mg, 0.40 mmol), 1-iodo-2-nitrobenceno (**8**) (118.5 mg, 0.47 mmol) y K_3PO_4 (260 mg, 1.22 mmol) en dioxano (2 mL) y agua (0.4 mL). La mezcla resultante se agitó a reflujo por 18 h, se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con Et_2O . La mezcla diluida se lavó con agua y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se concentró a presión reducida para dar un aceite amarillento que fue posteriormente purificado por cromatografía sobre gel de sílice, con mezclas de hexano- Et_2O (desde 9:1 a 8:2) como eluyente, para proporcionar el derivado de biarilo **26** (132 mg, 86%) como un aceite. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-3' PhPh), 7.60 (1H, ddd, $J = 9.0, 8.0, 1.5$ Hz, H-5' PhPh), 7.47 (1H, ddd, $J = 9.0, 8.0, 1.5$ Hz, H-4' PhPh), 7.42 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-6' PhPh), 7.34 (2H, m, H-2 y H-5 PhPh), 7.22 (2H, m, H-3 y H-5 PhPh), 2.97 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-5), 2.26 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 1.73 (4H, m, H-3 y H-4), 1.44 (9H, s, CMe_3); HRMS (EI), calculado para $C_{21}H_{25}NO_4S$ 387.15043, encontrado 387.15015.

Preparación del 5-(2'-aminobifenil-4-iltio)pentanoato de terc-butilo (27). Una disolución de NH_4Cl (8.9, 0.17 mmol) en agua (0.4 mL) se añadió gota a gota sobre una disolución agitada del nitro-bifenilo **26** (130 mg, 0.33 mmol) en EtOH (1.3 mL). Hierro en polvo (60 mg, 1.0 mmol) se añadió en pequeñas porciones y la mezcla heterogénea obtenida se calentó a reflujo con agitación durante 1h, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se diluyó con benceno y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía, usando hexano- Et_2O 6:4 como eluyente, para proporcionar el amino-bifenilo **27** (105 mg, 90%) como un aceite incoloro. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 (4H, br s, H-2/H-6 y H-3/H-5 PhPh), 7.15 (1H, ddd, $J = 9.0, 7.9, 1.5$ Hz, H-4' PhPh), 7.10 (1H, ddd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-6' PhPh), 6.82 (1H, ddd, $J = 9.0, 7.5, 1.0$ Hz, H-5' PhPh), 6.76 (1H, ddd, $J = 7.9, 1.0$ Hz, H-3' PhPh), 3.72 (2H, br s, NH_2), 2.97 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-5), 2.26 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-2), 1.74 (4H, m, H-3 y H-4), 1.44 (9H, s, CMe_3); HRMS (EI), calculado para $C_{21}H_{27}NO_2S$ 357.17625, encontrado 357.17558.

Preparación del 5-(2'-(2-cloronicotinamido)bifenil-4-iltio)pentanoato de terc-butilo (28). Una disolución del amino-bifenilo **27** (100 mg, 0.28 mmol) y cloruro de nicotinoilo (**19**) (54 mg, 0.30 mmol) en THF anhidro (1 mL) se agitó a temperatura ambiente por 3 h. Seguidamente el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía, eluyendo con mezclas de hexano- Et_2O (desde 8:2 a 2:8), para dar la amida **28** (120.3 mg, 87%) como un aceite. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.44 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3' PhPh), 8.43 (1H, dd, $J = 4.7, 1.9$, H-6 Py), 8.22 (1H, br s, NH), 8.12 (1H, dd, $J = 7.7, 1.9$ Hz, H-4 Py), 7.5-7.2 (8H, m, H-2/H-6, H-3/H-5, H-4', H-5', H-6' PhPh y H-5 Py), 2.96 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-5), 2.24 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 1.72 (4H, m, H-3 y H-4), 1.43 (9H, s, CMe_3); HRMS (EI), calculado para $C_{27}H_{29}^{35}ClN_2O_3S$ 496.15874, encontrado 496.15887.

Preparación del ácido 5-(2'-(2-cloronicotinamido)bifenil-4-iltio)pentanoico (29), Hapteno BLc5). Una disolución del éster *terc*-butilico **28** (120.2 mg, 0.24 mmol) en $HCOOH$ (5 mL) se agitó a temperatura ambiente por 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se añadió $CHCl_3$ y se concentró de nuevo para dar un residuo sólido que se cristalizó de benceno-hexano para proporcionar el hapteno BLc5 (**29**) (103 mg, 97%) como cristales blancos. P. f. 117-118 °C (cristalizado de C_6H_6 -hexano); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.64 (1H, br s, COOH), 8.44-8.41 (2H, m, H-6 Py y H-3' PhPh), 8.32 (1H, br s, NH), 8.16 (1H, dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, H-4 Py), 7.42-7.23 (8H, m, H-2/H-6, H-3/H-5, H-4', H-5', H-6' PhPh y H-5 Py), 2.95 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-5), 2.37 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-2), 1.75 (4H, m, H-3 y H-4); HRMS (EI), calculado para $C_{23}H_{21}^{35}ClN_2O_3S$ 440.09614, encontrado 440.09557.

2) Ensayos biológicos con los haptenos BLa5, BLb6 y BLc5.

a) Activación de haptenos

Todos los ejemplos de haptenos aquí presentados contienen un grupo carboxilo como grupo químico funcional para su inmovilización a proteínas transportadoras, concretamente por reacción con los grupos amino libres de la proteína. El grupo carboxilo se activó utilizando *N,N*-disuccinimidil carbonato (DSC) siguiendo protocolos previamente publicados [F.A. Esteve-Turrillas et al., *Anal. Chim. Acta* doi: 10.1016/j.aca.2010.09.042]. En concreto, se disolvió 0.082 mmol de hapteno 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 restante se purificó por cromatografía en columna, usando cloroformo como eluyente, obteniéndose el éster de *N*-hidroxisuccinimida del hapteno en forma pura como un aceite (hapteno activado).

b) 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, PBS conteniendo 0.05% (v/v) de Tween 20; CB, tampón carbonato-bicarbonato 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 .

5 c) Preparación de conjugados

i) Inmunógeno

10 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 hapteno activado en DMF. La reacción se llevó a cabo durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave y a continuación, el conjugado se purificó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación medido espectrofotométricamente fue de 11, 14 y 14 moléculas de hapteno por molécula de proteína para BLA5, BLb6 y BLc5, respectivamente.

ii) Conjugado o antígeno de ensayo

15 A 2.0 ml de una disolución de 15 mg/ml de proteína albúmina de huevo (OVA) en tampón CB se añadió gota a gota 100 μl de una disolución 100 mM de hapteno activado en DMF. La reacción se llevó a cabo durante 2.5 h a temperatura ambiente con agitación suave y a continuación, el conjugado se purificó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación medido espectrofotométricamente fue de 8, 8 y 9 moléculas de hapteno por molécula de proteína para BLA5, BLb6 y BLc5, respectivamente.

20 iii) Trazador o antígeno enzimático

25 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 μl de una disolución 10 mM (o 5 mM) de hapteno activado en DMF. La reacción se llevó a cabo durante 4 h a temperatura ambiente con agitación suave y a continuación, el conjugado se purificó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 usando tampón PB como eluyente. El grado de conjugación medido espectrofotométricamente fue de 6, 5 y 3 moléculas de hapteno por molécula de proteína para BLA5, BLb6 y BLc5, respectivamente.

d) Inmunización de conejos

30 Se inmunizaron 2 hembras de conejo blancas de la raza New Zealand con cada conjugado BSA-hapteno siguiendo protocolos estandarizados [C. Suárez-Pantaleón et al., *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8502-8511]. Cada animal recibió 0.3 mg de uno de los conjugados 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 exsanguinados y la sangre obtenida se dejó coagular a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperó el suero por centrifugación, se diluyó a $\frac{1}{2}$ con PBS frío y se le añadió un volumen de sulfato amónico saturado. El precipitado proteico resultante 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.

e) Procedimiento ELISA

40 Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada antisuero se evaluó en los dos formatos clásicos de ELISA competitivo (el de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta y el de anticuerpo inmovilizado con detección directa) usando tanto conjugados homólogos como heterólogos. 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 H_2O_2 . Este revelado se desarrolló durante 10 min a temperatura ambiente y se paró usando 100 μl por pocillo de H_2SO_4 2.5 M. Al finalizar los ensayos, la absorbancia de cada pocillo se leyó a 492 nm usando una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de microplacas PowerWave HT (Biotek Instruments, Winooski, USA). Las curvas patrón sigmoideas obtenidas al representar la absorbancia frente a la concentración de analito se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros usando el paquete informático SigmaPlot de SPSS (Chicago, USA). El título del antisuero se definió como el recíproco de la dilución del antisuero que proporciona una señal máxima (A_{max}) 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 (IC_{50}) se estimó como la concentración de analito libre capaz de reducir a la mitad la señal máxima.

i) Ensayos ELISA competitivos en formato de antígeno o conjugado inmovilizado con detección indirecta

Las placas se tapizaron con 100 µl por pocillo de una disolución de conjugado OVA-hapteno a 1.0 o a 0.1 µg/ml en tampón CB por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones seriadas de los antisueros con un factor de dilución de 1/3 en PBST. 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 antisuero en PBST. La misma distribución de reactivos se repitió para cada placa con un conjugado diferente. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. A continuación, cada pocillo recibió 100 µl de una dilución 1/10000 de GAR-HRP (conjugado comercial de peroxidasa con anticuerpos de cabra contra anticuerpo de conejo) 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.

ii) Ensayos ELISA competitivos en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

Las placas se tapizaron con 100 µl por pocillo de una dilución de antisuero en tampón CB por incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones seriadas del conjugado enzimático HRP-hapteno con un factor de dilución de 1/3 en PBST. 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 trazador enzimático determinado en PBST. La misma distribución de reactivos se repitió para cada placa con un antisuero diferente. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. Finalmente, se reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito.

3) Resultados

i) Respuesta inmune

Los seis inmunógenos produjeron respuestas inmunes semejantes y equivalentes con títulos entre 3×10^5 y 1×10^6 (**Figura 4**).

ii) Selección de las mejores combinaciones de inmunorreactivos

Cada uno de los antisueros obtenidos se ensayó frente a conjugados de todos los haptenos (homólogos y heterólogos) usando el ensayo de tipo ELISA competitivo, tanto en formato de ensayo de conjugado inmovilizado con detección indirecta como en el formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa. Se ensayaron diferentes concentraciones de conjugado frente a diferentes concentraciones de antisuero en ensayo competitivo utilizando como competidor diferentes concentraciones de boscalid preparadas por dilución seriada. A partir de todos los haptenos fue posible generar anticuerpos capaces de reconocer al boscalid con elevada afinidad. Este resultado confirma la idoneidad de las estructuras propuestas para el objetivo que se persigue. Los valores de IC_{50} y de la pendiente de la curva de inhibición resultante para cada combinación de inmunorreactivos se han incluido en la Tabla 1 (a-c) (Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo de conjugado inmovilizado con detección indirecta) y la Tabla 2 (a-c) (Resultado de los ensayos en formato ELISA competitivo de anticuerpo inmovilizado con detección directa).

Tabla 1a

Antisuero	OVA-BLa5				
	Conjugado (µg/ml)	Título As. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pend.	IC_{50} (nM)
BLa5#1	0.01	30	0.91	0.82	3.8
	0.1	300	1.05	0.67	2.5
BLa5#2	0.01	100	0.94	0.72	4.0
	0.1	1000	0.97	0.55	2.7
BLb6#1	0.1	30	0.73	1.07	1.1
	1	100	0.64	0.85	7.7
BLb6#2	0.1	30	0.74	1.09	0.3
	1	30	1.39	0.79	1.5
BLc5#1	0.1	100	1.06	0.83	1.3
	1	300	0.85	0.68	6.0
BLc5#2	0.1	30	1.05	0.70	14.9
	1	100	1.24	0.33	33.3

Tabla 1b

OVA-BLb6					
Antisuero	Conjugado ($\mu\text{g/ml}$)	Título As. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pend.	IC_{50} (nM)
BLa5#1	0.1	10	0.73	0.89	0.6
	1	30	1.41	0.68	1.2
BLa5#2	0.1	30	1.22	1.19	2.1
	1	100	0.96	0.52	1.5
BLb6#1	0.01	30	1.13	0.70	1.5
	0.1	300	1.11	0.62	0.9
BLb6#2	0.01	30	1.18	0.75	1.3
	0.1	300	0.91	0.60	1.1
BLc5#1	0.1	30	0.76	0.76	2.3
	1	30	1.06	0.67	24.8
BLc5#2	0.1	10	0.81	1.12	3.1
	1	30	1.29	0.96	5.1

Tabla 1c

OVA-BLc5					
Antisuero	Conjugado ($\mu\text{g/ml}$)	Título As. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pend.	IC_{50} (nM)
BLa5#1	0.1	100	1.21	0.73	3.1
	1	300	0.85	0.51	23.6
BLa5#2	0.1	300	0.78	0.71	5.0
	1	300	1.27	0.56	78.0
BLb6#1	0.1	100	0.71	0.65	0.9
	1	300	0.62	0.50	1.3
BLb6#2	0.1	100	0.88	0.81	1.6
	1	100	1.11	0.62	26.8
BLc5#1	0.01	100	1.36	0.76	2.7
	0.1	1000	0.69	0.71	4.7
BLc5#2	0.01	100	1.14	0.76	4.9
	0.1	300	1.21	0.65	15.7

Tabla 2a

HRP-BLa5					
Antisuero	Trazador (ng/ml)	Dil. As. ($\times 10^3$)	A_{\max}	Pend.	IC_{50} (nM)
BLa5#1	3	60	0.79	0.52	1.1
	3	30	1.03	0.71	4.3
BLa5#2	3	60	1.00	0.61	4.7
	3	30	1.32	0.65	13.9
BLb6#1	30	10	0.96	0.96	1.5
	30	3	1.33	0.89	2.8
BLb6#2	30	10	0.86	0.82	0.9
	30	3	0.70	0.84	0.6
BLc5#1	10	10	1.25	0.94	2.5
	10	3	1.92	0.93	2.6
BLc5#2	30	10	1.25	0.63	10.5
	10	3	0.90	0.68	5.4

Tabla 2b

HRP-BLb6					
Antisuero	Trazador (ng/ml)	Dil. As. ($\times 10^3$)	A_{\max}	Pend.	IC_{50} (nM)
BLa5#1	30	10	0.61	0.99	0.8
	30	3	0.67	1.55	2.7
BLa5#2	10	10	1.50	1.48	2.6
	10	3	2.30	1.35	2.5
BLb6#1	3	60	0.73	0.66	1.7
	3	30	0.91	0.68	6.0
BLb6#2	10	60	1.25	0.72	6.7
	3	30	1.25	0.54	3.4
BLc5#1	10	10	1.20	1.05	4.7
	10	3	1.70	0.91	4.7
BLc5#2	100	10	0.48	0.86	35.1
	100	3	0.77	0.75	19.4

Tabla 2c

Antisuero	HRP-BLc5				
	Trazador (ng/ml)	Dil. As. (x10 ³)	A _{max}	Pend.	IC ₅₀ (nM)
BLa5#1	10	10	1.04	0.76	2.8
	10	3	1.24	0.82	2.8
BLa5#2	10	10	1.39	0.84	5.0
	10	3	1.89	1.05	5.8
BLb6#1	10	10	0.92	0.78	2.6
	10	3	1.51	0.75	3.1
BLb6#2	10	10	1.52	0.82	1.5
	10	3	1.24	0.85	2.2
BLc5#1	3	60	1.17	0.54	2.4
	3	30	1.56	0.69	5.8
BLc5#2	3	60	1.25	0.76	4.6
	3	30	1.59	0.75	7.6

5 En la **Figura 5** se muestran las curvas de inhibición obtenidas con el antisuero BLb6#2 y el conjugado de BLa5, tanto en formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta como con el formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa. Para el ensayo indirecto se empleó 0.01 µg de conjugado por pocillo y la dilución del antisuero en la etapa de competición fue de 1/30000. En el caso del ensayo con formato directo, el pocillo se tapizó con 100 µL de una disolución del antisuero a 1/3000 y en la etapa competitiva se usó 3 ng de trazador enzimático heterólogo.

REIVINDICACIONES

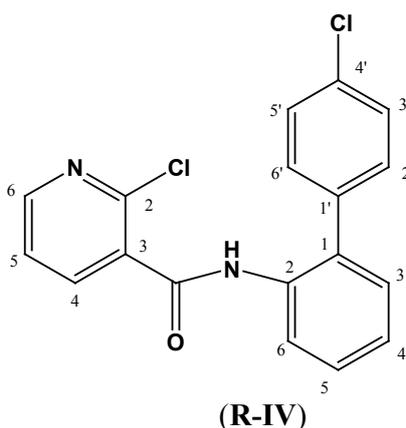
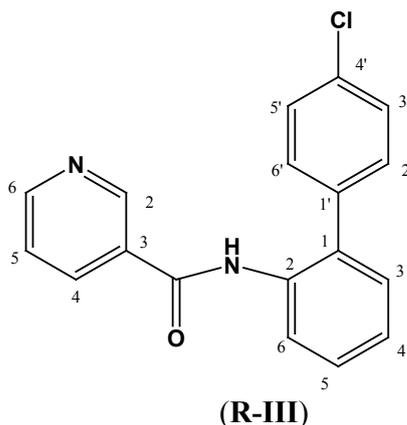
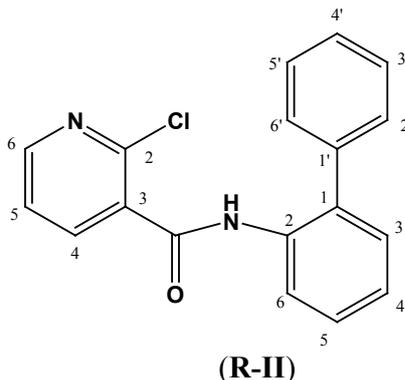
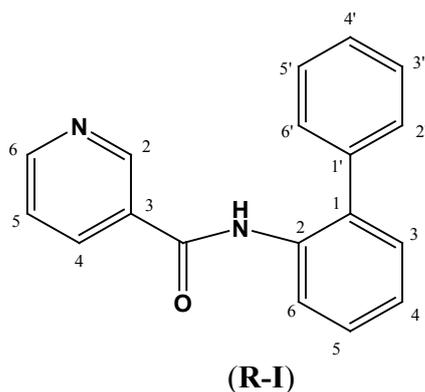
1. Un compuesto de fórmula general (I):



(I)

donde

5 **B** se selecciona entre uno cualquiera de los siguientes radicales (R-I), (R-II), (R-III) y (R-IV):



X puede estar presente o no y se selecciona entre O, S, NH y un átomo de carbono saturado o insaturado;

10 **L** representa un espaciador de 0 a 40 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada y que puede comprender hasta dos estructuras de anillo y entre 0 y 20 heteroátomos siendo los heteroátomos seleccionados entre S, O y N, con la condición de que no más de dos heteroátomos puedan unirse en secuencia; e

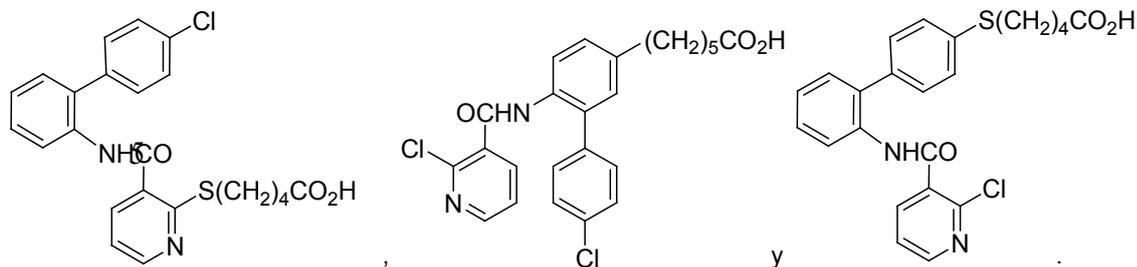
Y es un grupo funcional seleccionado entre -COOH, -OH, -NH₂, -NH-, -N₃, -CH₂Cl, -CHCl-, -CH₂Br, -CHBr-, -CH₂I, -CHI-, -CHO, -SH, -S-S-, -SO₃H, -OSO₂Ph, -OSO₂Ar, -NH-NH₂ y -C(=N-NH₂)-

15 2. El compuesto según la reivindicación 1, donde **X** se selecciona entre S y C.

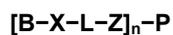
3. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde **L** representa un espaciador de 0 a 8 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal.

4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde **Y** es un grupo funcional conjugable seleccionado entre un -COOH, -CHO, -NH₂ y -SH.

20 5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona entre:



6. Un compuesto de fórmula general (II):

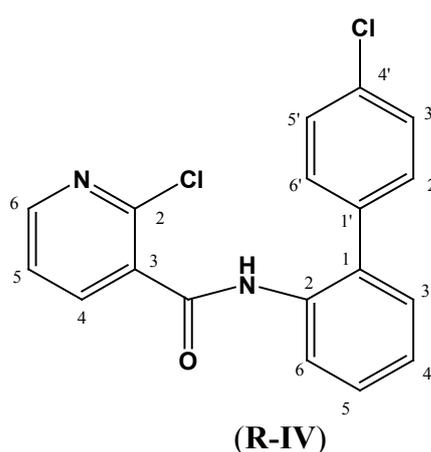
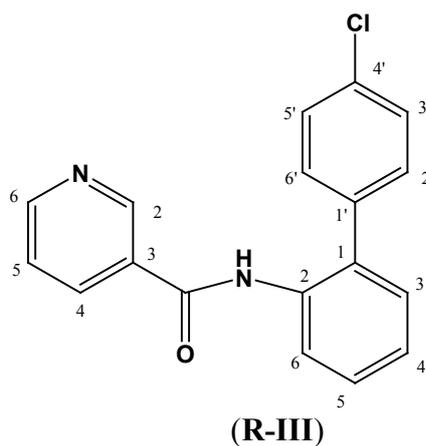
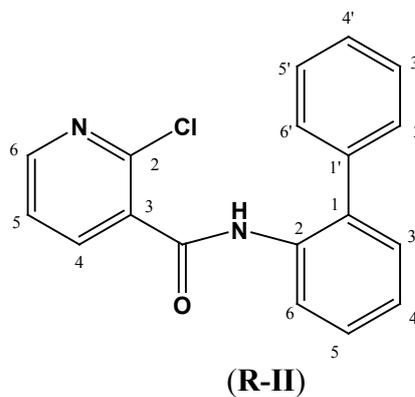
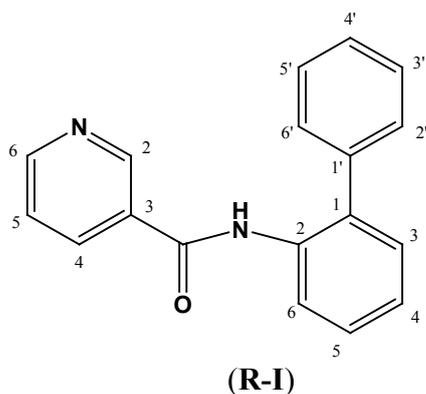


10

(II)

donde

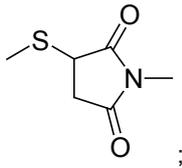
B se selecciona entre uno cualquiera de los siguientes radicales (**R-I**), (**R-II**), (**R-III**) y (**R-IV**):



15 **X** puede estar presente o no y se selecciona entre O, S, NH y un átomo de carbono saturado o insaturado;

L representa un espaciador de 0 a 40 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada y que puede comprender hasta dos estructuras de anillo y entre 0 y 20 heteroátomos siendo los heteroátomos seleccionados entre S, O y N, con la condición de que no más de dos heteroátomos puedan unirse en secuencia;

20 **Z** es un grupo funcional seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, -NHCONH-, -NHCSNH-, -OCONH-, -NHOCO-, -OCSNH-, -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH- y



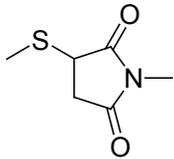
P se selecciona del grupo formado por péptidos, polipéptidos, polisacáridos o polímeros sintéticos; y

n es un número entero seleccionado entre 1 y 50 por cada 50 kilodaltons de peso molecular de **P**.

7. El compuesto según la reivindicación 6, donde **X** se selecciona entre S y C.

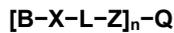
5 8. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, donde **L** representa un espaciador de 0 a 8 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal.

9. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde **Z** se selecciona entre un grupo -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S- y



10 10. El compuesto según las reivindicaciones 6 a 9, donde **P** se selecciona, del grupo formado por albúmina, tiroglobulina, hemocianina, beta-galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa u oxidasa.

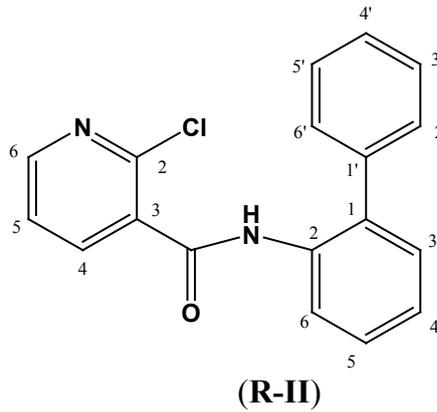
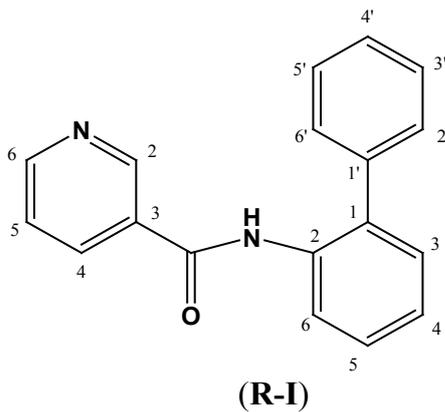
11. Un compuesto de fórmula general (III):

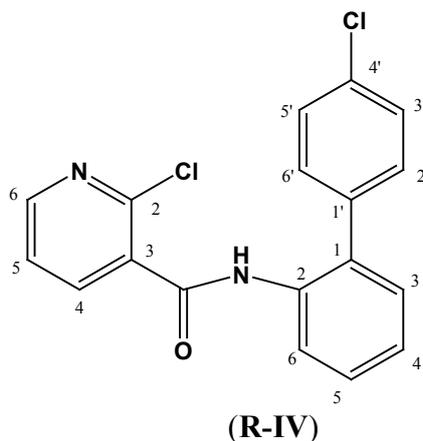
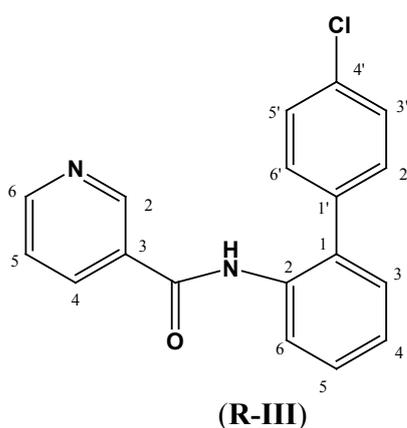


(III)

15 donde

B se selecciona entre uno cualquiera de los siguientes radicales (**R-I**), (**R-II**), (**R-III**) y (**R-IV**):

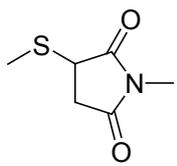




X puede estar presente o no y se selecciona entre O, S, NH y un átomo de carbono saturado o insaturado;

5 **L** representa un espaciador de 0 a 40 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada y que puede comprender hasta dos estructuras de anillo y entre 0 y 20 heteroátomos siendo los heteroátomos seleccionados entre S, O y N, con la condición de que no más de dos heteroátomos puedan unirse en secuencia;

Z es un grupo funcional seleccionado entre -CONH-, -NHCO-, -NHCONH-, -NHCSNH-, -OCONH-, -NHOCO-, -OCSNH-, -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH- y



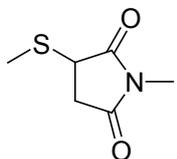
10 **Q** es un marcador químico isotópico o no isotópico; y

n es un número entero entre 1 y 50 por cada 50 kilodaltons de peso molecular de **Q**.

12. El compuesto según la reivindicación 11, donde **X** se selecciona entre S y C.

13. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde **L** representa un espaciador de 0 a 8 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal.

15 14. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde **Z** se selecciona entre un grupo -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S- y



20 15. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde **Q** se selecciona, entre biotina, fluoresceína y sus derivados, fluoróforos de cianinas, de rodaminas o de cumarinas, bipiridilos de rutenio, derivados de TEXAS RED y de BODIPY, luciferina y derivados, ésteres de acridinio, así como partículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

16. Un anticuerpo generado en respuesta a un inmunógeno de fórmula general (II):



(II)

25 tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.

17. Método de detección de boscalid en una muestra aislada que comprende las siguientes etapas:

- a. poner en contacto una muestra aislada con el anticuerpo generado según la reivindicación 16;
- b. incubar la muestra aislada y el anticuerpo del paso (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica y
- 5 c. determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación del paso (b).

18. El método según la reivindicación 17, donde la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso c se realiza mediante un inmunoensayo.

19. Kit de detección de boscalid, que comprende los anticuerpos según la reivindicación 16.

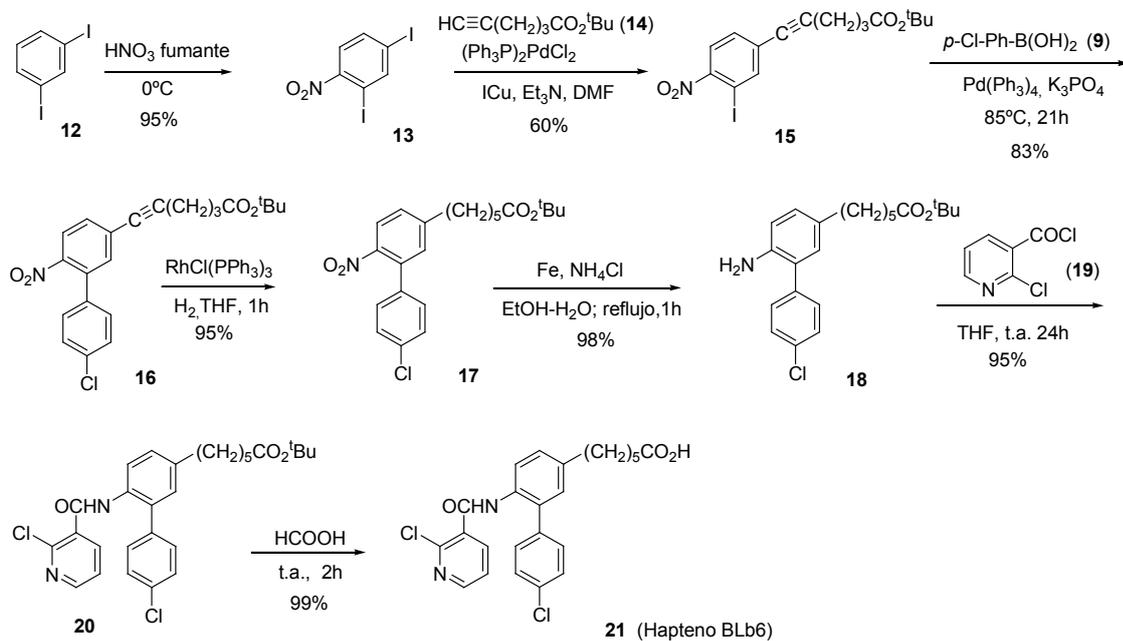


FIG. 2

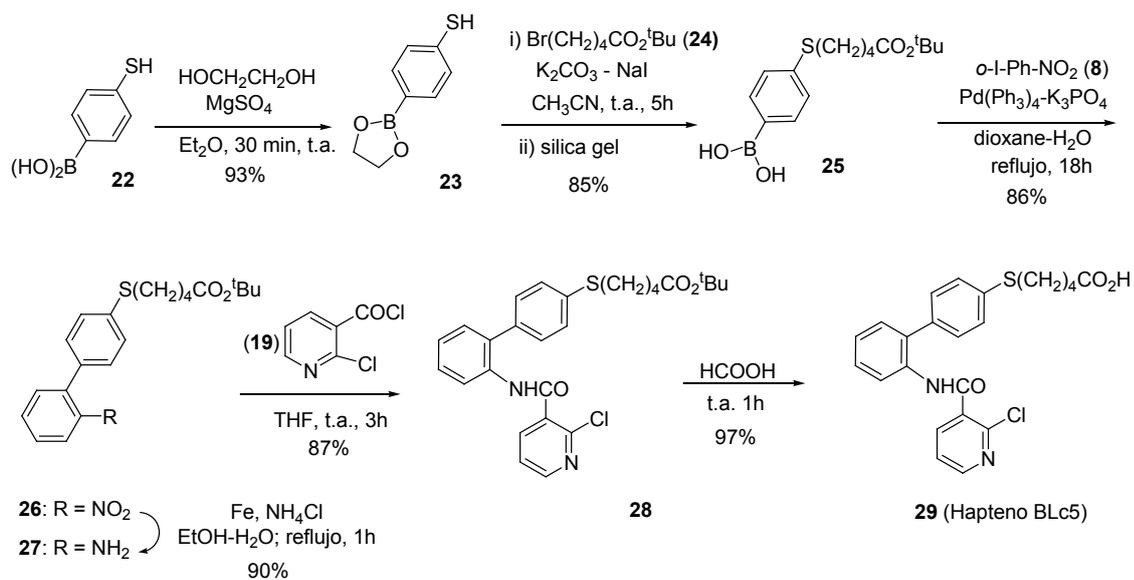


FIG. 3

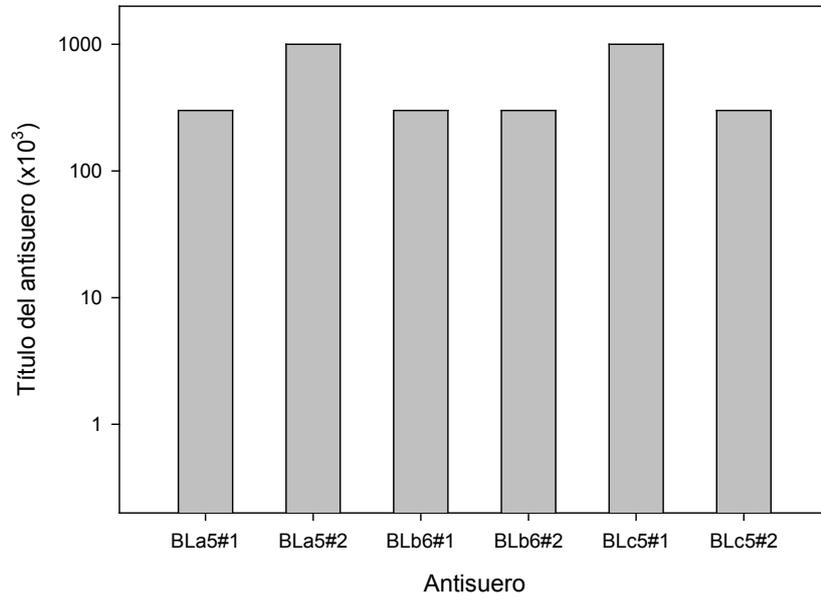


FIG. 4

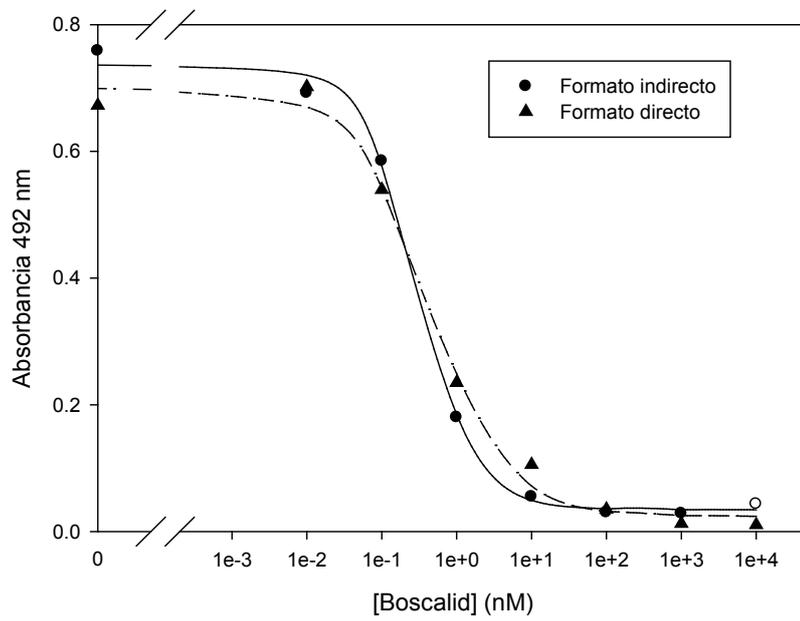


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201031671

②² Fecha de presentación de la solicitud: 12.11.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LOHMANN, W. et al. "On-line Electrochemistry/Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Simulation of Pesticide Metabolism". Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2009, Volumen 20, Número 1, páginas 138-145. [Disponible en línea el 07.09.2008]. Ver especialmente página 139, esquema 1.	1,3,6-8
X	WO 2002009648 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 07.02.2002, página 4, línea 10 – página 6, línea 15.	1-4,6-9
X	ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, USA. "Boscalid; 3-pyridinecarboxamide, 2-chloro-N-(4'-chloro[1,1'-biphenyl]-2-yl); Pesticide Tolerance". Federal Registry 2003, Volumen 68, Número 146, páginas 44640-44651. Ver página 44640, columna 3.	1,3,4
X	WO 2004058723 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 15.07.2004, página 2, línea 14 – página 3, línea 10; página 54, tabla 9.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.04.2011

Examinador
G. Esteban García

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D213/82 (2006.01)
G01N33/531 (2006.01)
G01N33/533 (2006.01)
G01N33/534 (2006.01)
A01N43/40 (2006.01)
C07K16/00 (2006.01)

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

C07D, G01N, A01N, C07K

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

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5,10-18	SI
	Reivindicaciones 1-4,6-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5,10-18	SI
	Reivindicaciones 1-4,6-9	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	LOHMANN, W. et al. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2009, Vol. 20, Nº 1, pp. 138-145.	07.09.2008
D02	WO 2002009648 A2	07.02.2002
D03	ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, USA. Federal Registry 2003, Vol. 68, Nº 146, pp. 44640-44651.	2003
D04	WO 2004058723 A1	15.07.2004

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 general (I) con estructura derivada de **boscalid**, un compuesto de fórmula general (II) derivado del mismo que comprende además un polímero, un compuesto de fórmula general (III) derivado de (I) que comprende un marcador químico, un anticuerpo generado en respuesta a un inmunógeno de fórmula general (II), un método de detección de boscalid basado en dicho anticuerpo y un kit de detección de boscalid que comprende el anticuerpo.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga un derivado hidroxilado de boscalid que se incluye en la fórmula I de la invención (**B** es R-IV, **X** y **L** no están presentes, **Y** es OH), así como los aductos covalentes del mismo y del propio boscalid que comprenden glutatión (GSH), y que se incluyen en la fórmula general II de la invención (**B** es R-IV, **X** y **L** no están presentes, **Z** es S, **P** es el tripéptido glutatión y n es 1) (ver página 139, esquema 1).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 3, 6-8** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga varias series de compuestos de fórmula (I) derivados de bifenilo con actividad antimicrobiana, entre los que se encuentran los que poseen un anillo de piridina unido al resto bifenilo mediante un grupo carboxamida, que solapan con el compuesto (I) de la invención, cuando **X** e **Y** son CH, R₂ es -NHCOR₆, R₆ es piridina y R₁ es CH₂NR₅R_{5'} (siendo **L**=CH₂ e **Y**=NR₅R_{5'} en la fórmula I de la invención), y con el compuesto II de la invención, cuando R₁ es -(CO)QNR₅R_{5'}, siendo Q un péptido (equivalente a **P** en la fórmula I de la invención) (ver página 4, línea 10-página 6, línea 15).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-4, 6-9** no presenta novedad a la luz de lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga el compuesto conjugado derivado de 2-cloro-N-(4'-cloro-5-hidroxi-bifenil-2-il)nicotinamida y ácido glucurónico, como uno de los metabolitos de boscalid (ver página 44640, columna 3). Este compuesto responde a la fórmula general I de la invención, donde **B** es R-IV, **X** es O, **L** es un anillo de piranosido e **Y** es un grupo COOH (compuesto con RN 661463-88-3).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1, 3 y 4** no es nuevo según lo divulgado en el documento D03.

El documento D04 divulga una serie de compuestos de fórmula general (I) derivados de carboxamida con actividad fungicida (ver página 1, líneas 2-9), que cuando **X** es O, R₁ es H, Het es piridina, y alguno de los sustituyentes R₂-R₇ es, por ejemplo, CHO (ver página 2-línea 14-página 3, línea 10), solapan con la fórmula general (I) de la invención. Entre estos compuestos se encuentra el compuesto **9.146**, en el que **B** es R-II, **L** es -CH=CH- e **Y** es Cl (ver página 54, tabla 9).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-3** no es nuevo según lo divulgado en el documento D04.

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones **5**, que se refiere a compuestos concretos de fórmula **(I)**; **10**, relativa a compuestos de fórmula **(II)** en los que P es un péptido concreto seleccionado entre una lista; **11**, relativa a un compuesto de fórmula **(III)** que comprende un marcador químico; **12**, que se refiere a un anticuerpo generado en respuesta a un inmunógeno de fórmula general **(II)**; y por tanto, tampoco hacia las reivindicaciones **17** y **18**, que se refieren, respectivamente, a un método de detección de boscalid basado en dicho anticuerpo y a un kit de detección de boscalid que comprende el anticuerpo.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **5** y **10-18** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.