

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 415**

21 Número de solicitud: 201231583

51 Int. Cl.:

C07K 14/00	(2006.01)	C12N 9/38	(2006.01)
C07D 405/02	(2006.01)		
G01N 33/531	(2006.01)		
G01N 33/533	(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:
16.10.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:
19.05.2014

Fecha de la concesión:
09.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:
16.03.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070705

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;
ESTEVE TURRILLAS, Francesc Albert;
ABAD FUENTES, Antonio;
ABAD SOMOVILLA, Antonio y
AGULLÓ BLANES, Consuelo**

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **DERIVADOS FUNCIONALIZADOS E INMUNORREACTIVOS PARA EL FUNGICIDA
FLUDIOXONIL**

57 Resumen:
Derivados funcionalizados e inmunorreactivos para el fungicida fludioxonil.

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

ES 2 461 415 B1

DERIVADOS FUNCIONALIZADOS E INMUNORREACTIVOS PARA EL FUNGICIDA FLUDIOXONIL

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a haptenos, conjugados, derivados marcados y anticuerpos para fludioxonil. Además, la presente invención también se refiere a un método de análisis de fludioxonil utilizando los anticuerpos obtenidos, en ocasiones junto con antígenos de ensayo que son conjugados o derivados marcados.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 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 fludioxonil, un compuesto de la familia de los fenilpirroles. Este plaguicida bloquea la acción de una enzima encargada de catalizar la fosforilación de la enzima reguladora de la síntesis del glicerol, compuesto que regula la presión osmótica intracelular del hongo. De esta manera se estimula la síntesis del glicerol que, al acumularse, produce una hipertrofia que acaba destruyendo las células del hongo. El fludioxonil (4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carbonitrilo) es un producto de uso agroquímico comercializado a nivel mundial por Syngenta. En la actualidad las denominaciones comerciales más habituales son Switch, Beret y Celest, encontrándose también en forma de formulaciones combinadas con otros fungicidas, entre los que destaca ciprodinil. Su utilización como fungicida postcosecha está autorizada tanto en cítricos como en frutas de hueso y pepita. El fludioxonil fue incluido en el anexo I de la UE en el 2008. Entre los cultivos para los que la UE ha establecido límites máximos de residuos de forma explícita se encuentran los cítricos (7–10 ppm), frutas de hueso o de pepita (5–7 ppm), bayas (1–5 ppm), uva (4–5 ppm), fresa (3 ppm) y ciruelas (0.5 ppm), además de una gran variedad de otras frutas 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 fungicidas a través de los alimentos.

Los inmunoensayos son técnicas bioanalíticas basadas en la interacción de un antígeno (el analito) con un anticuerpo que lo reconoce específicamente. No obstante, un plaguicida es una molécula orgánica pequeña que constituye un único sitio de unión al anticuerpo, por lo que en este tipo de técnicas analíticas la interacción entre el analito y el anticuerpo se realiza por desplazamiento de la unión entre el anticuerpo y un análogo marcado del analito. De este modo, en presencia del analito se establece una competencia entre éste y el análogo marcado por la unión al anticuerpo. Habitualmente, el marcaje se realiza con una actividad enzimática, dando así lugar a los enzimoensayos. Cuando además uno de los participantes en la reacción se encuentra inmovilizado sobre un soporte sólido, la técnica se denomina ELISA (del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Los primeros inmunoensayos enzimáticos para plaguicidas se desarrollaron durante la primera mitad de los años 80. Desde entonces hasta la actualidad el número de plaguicidas para los cuales se han desarrollado inmunoensayos ha aumentado espectacularmente, suponiendo varias decenas y cubriendo los principales

grupos de compuestos: insecticidas, herbicidas y fungicidas. De hecho, un gran número de estos ensayos están disponibles comercialmente en forma de kits con diferentes formatos. La creciente aceptación de los inmunoensayos como técnicas complementarias a las cromatográficas para el análisis de pequeñas moléculas orgánicas se debe a que se trata de una metodología sencilla, rápida y de bajo coste, exhibiendo al mismo tiempo una elevada sensibilidad y especificidad. Los inmunoensayos permiten detectar específicamente el analito diana en mezclas muy complejas, simplificando considerablemente los laboriosos procedimientos de preparación de la muestra, lo que a su vez redundará en un aumento en la capacidad de muestreo. Además, los inmunoensayos pueden realizarse en formatos portátiles, lo que los independiza de los laboratorios centralizados y los convierte en idóneos para el análisis en los puntos de producción. Las excelencias analíticas atribuidas a los inmunoensayos ya han sido demostradas en muchas aplicaciones prácticas, donde han competido favorablemente con las técnicas cromatográficas [M.C. Hennion, *Analysis* 1998, 26,149–155; A. Abad et al., *J. Chromatogr. A* 1999, 833, 3–12; A. Abad et al., *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1707–1712; N.A. Lee y I.R. Kennedy, *J. AOAC Int.* 2001, 84, 1393–1406; F.A. Esteve-Turrillas et al., *Anal. Chim. Acta* 2010, 682, 93–103].

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

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

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

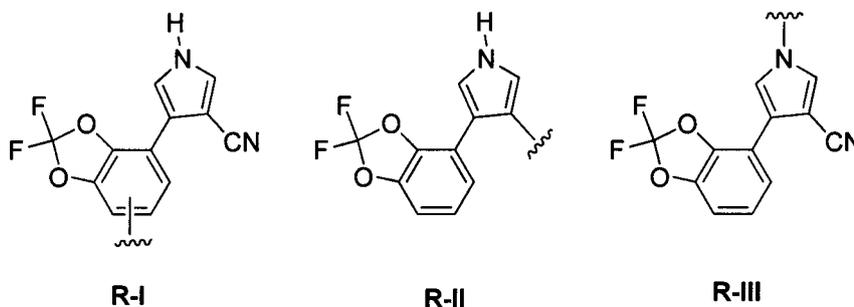
La presente invención proporciona haptenos de fludioxonil, compuestos de fórmula (I), que presentan una funcionalización adecuada, en diferentes posiciones de la molécula, para la obtención de conjugados de fludioxonil o derivados marcados de fludioxonil.

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



caracterizado porque

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



donde

R-I se selecciona del grupo que consiste en

[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],
[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y
[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

R-II es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

R-III es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada de 0 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; e

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

con la condición de que:

- cuando T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo], L es una cadena lineal hidrocarbonada de 2 a 40 átomos de carbono,
- cuando T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo] e Y es COOH, L es una cadena hidrocarbonada de 4 a 40 átomos de carbono,

- c) cuando T es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo] e Y es COOH, L es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono.

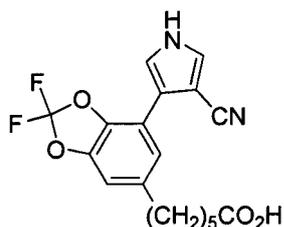
En la presente solicitud de patente se entiende por arilo (-Ar) un grupo carbocíclico aromático con un único anillo, por ejemplo fenilo, múltiples anillos, por ejemplo bifenilo, o múltiples anillos condensados donde al menos uno de ellos es aromático, por ejemplo 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, 1-naftilo,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

Según una realización preferida, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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 -COOH, -CHO, -C≡CH, -NH₂ y -SH. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente invención se caracteriza porque Y es -COOH.

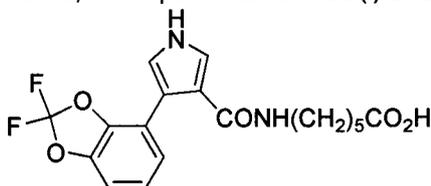
Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque T se selecciona del grupo que consiste en [4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo], [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo]; L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; e Y se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -C≡CH, -NH₂ y -SH. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 8 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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



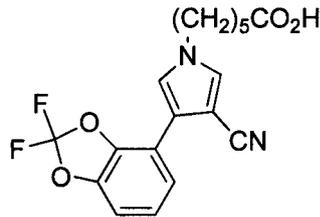
Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque T es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo]; L es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 20 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; e Y se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -C≡CH, -NH₂ y -SH. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 8 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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

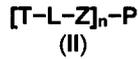


Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) tal como se describe en esta solicitud de patente se caracteriza porque T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo]; L es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 a 20 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; e Y se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -C≡CH, -NH₂ y -SH. Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 a 8 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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

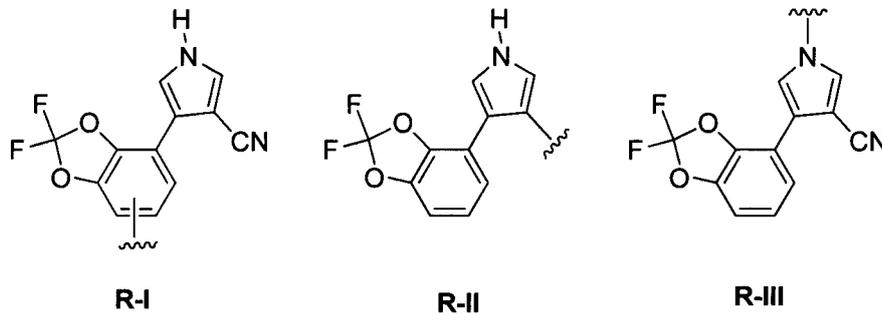


Un segundo aspecto de la presente invención describe un compuesto de fórmula (II):



caracterizado porque

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



donde

R-I se selecciona del grupo que consiste en

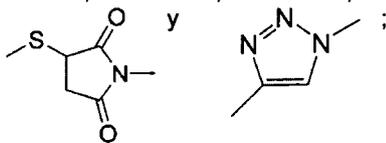
[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],
[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y
[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

R-II es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

R-III es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada de 0 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-, -OCNH-, -NHOCO-, -OCSNH-, -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -OCO-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH-, -NR-;



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

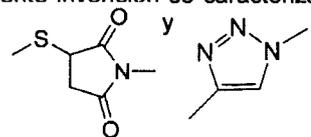
n es un número con un valor entre 1 y 500.

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 fludioxonil, para determinar o detectar este fungicida en una muestra mediante la tecnología de inmunoensayo competitivo.

Según una realización preferida, el compuesto de fórmula (II) se caracteriza porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N. Preferentemente, la cadena hidrocarbonada lineal comprende entre 0 y 8 átomos de carbono y entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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



5

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

10

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.

15

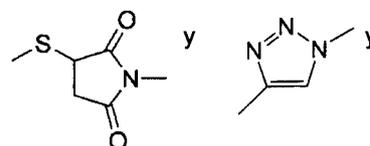
Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (II) de la presente invención se caracteriza porque T se selecciona del grupo que consiste en

[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],
[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y
[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

20

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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

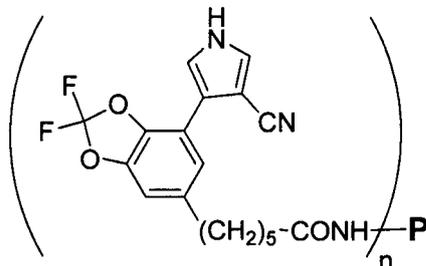


25

P se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

30

Según una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (II) es



donde P se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y n es un valor seleccionado entre 1 y 50.

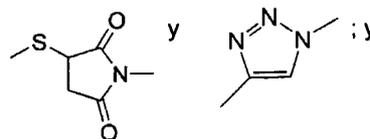
35

Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (II) de la presente invención se caracteriza porque T es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

40

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

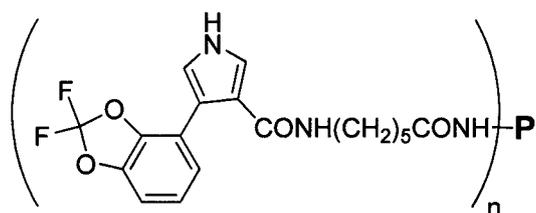


45

P se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

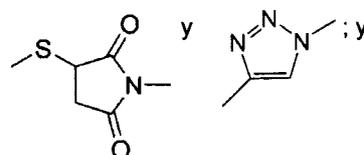
50

Según una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (II) es



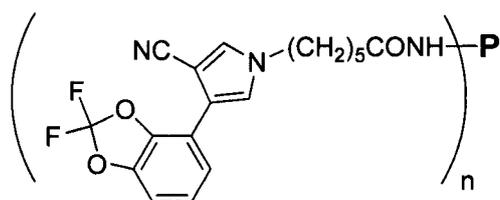
donde **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa, y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

- 5 Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (II) de la presente invención se caracteriza porque **T** es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo]; **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; **Z** se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



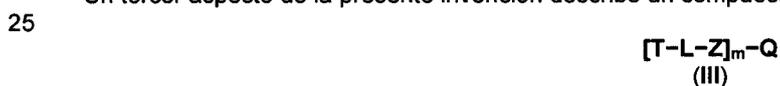
- 10
15 **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

Según una realización aún más preferida, el compuesto de fórmula (II) es



- 20 donde **P** se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y **n** es un valor seleccionado entre 1 y 50.

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



caracterizado porque

- 30 **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.

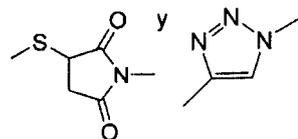
- 35 En la presente invención se entiende por marcador cualquier molécula o fragmento que dé lugar a una señal medible por cualquier tipo de técnica analítica. En la presente invención, **Q** del compuesto de fórmula (III) identifica un fragmento o una molécula química detectora, marcadora o trazadora.

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

- 40 Según una realización preferida, el compuesto de fórmula (III) se caracteriza porque **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N. Preferentemente, **L** es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 8 átomos de carbono y comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

45

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-.

10 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.

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

20 Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (III) de la presente invención se caracteriza porque T se selecciona del grupo que consiste en

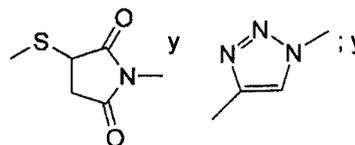
[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzodioxol-5-ilo],

[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzodioxol-5-ilo] y

[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzodioxol-4-ilo];

25 L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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

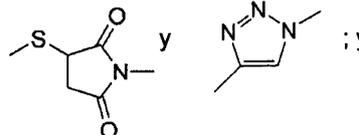


35 Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio, nanopartículas cuánticas, 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 [4-(2,2-difluorobenzodioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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

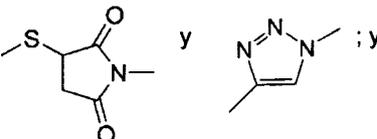


45 Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera de sus derivados, un éster de acridinio, nanopartículas cuánticas,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

50 Según otra realización preferida, el compuesto de fórmula (III) de la presente invención se caracteriza porque T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzodioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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



60 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, nanopartículas cuánticas, y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

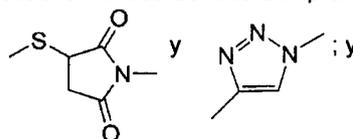
Un cuarto aspecto de la presente invención describe un anticuerpo generado en respuesta a un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en esta solicitud de patente.

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 se selecciona del grupo que consiste en
 [4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],
 [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y
 [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

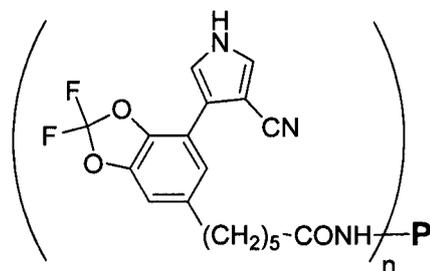
L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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 es el compuesto



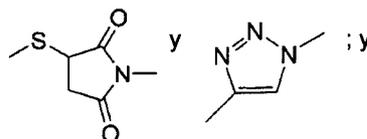
donde P es albúmina y n es un valor seleccionado entre 1 y 50.

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 [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

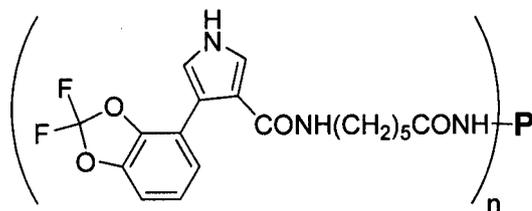
L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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) es



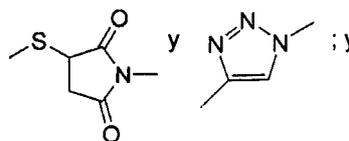
donde P es albúmina y n es un valor seleccionado entre 1 y 50.

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 [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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

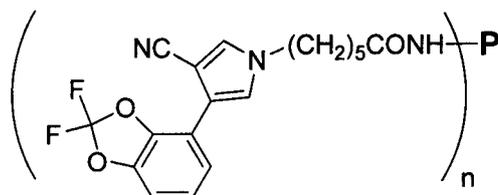


5

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

10

Preferentemente, el compuesto de fórmula (II) que genera un anticuerpo tal como se describe en esta solicitud de patente es



donde P es albúmina y n es un valor seleccionado entre 1 y 50.

15

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

- poner en contacto la muestra con el anticuerpo descrito en esta solicitud de patente;
- incubar la muestra y el anticuerpo del paso (a) durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una reacción inmunoquímica; y
- determinar la existencia de reacción inmunoquímica tras la incubación del paso (b).

20

El método de la presente invención permite la determinación cuantitativa o análisis cualitativo del contenido del fungicida fludioxonil en una muestra. Así mismo, el método de la presente invención permite analizar el contenido de fludioxonil en diferentes tipos de muestras, por ejemplo, muestras de 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 fludioxonil en un alimento.

25

Según una 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 (II) tal como se describe en esta solicitud de patente. Preferentemente, el inmunoensayo competitivo es de tipo ELISA.

30

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.

35

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.

40

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.

45

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.

50

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

55

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

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

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

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

10 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 carbonato de *N,N*-disuccinimidilo. 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 Para preparar anticuerpos frente a fludioxonil se requiere la preparación de derivados funcionalizados de dicho fungicida, es decir, análogos estructurales de fludioxonil 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 fludioxonil por un espaciador **L**. La posición de incorporación del grupo funcional a la estructura de fludioxonil 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 fludioxonil 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.

45 A continuación se ilustra con algunos ejemplos y figuras la forma en que puede efectuarse la preparación de varios derivados de fludioxonil 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.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) FDa6.

Figura 2. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) FDc6.

55 Figura 3. Esquema de la síntesis del compuesto de fórmula (I) FDn6.

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 para fludioxonil, y el término II-ANT significa compuesto de fórmula (II) que puede actuar como competidor en un ensayo inmunológico competitivo.

60 Figura 5. Señales obtenidas frente a 0.01 µg de compuesto de fórmula (II) homólogo inmovilizado con los anticuerpos anti-fludioxonil a diluciones de 3×10^4 (negro), 10^5 (gris claro) y 3×10^5 (gris oscuro).

Figura 6. Curva estándar para fludioxonil en el formato de ELISA competitivo indirecto.

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 (II) para la obtención de anticuerpos anti-fludioxonil. 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 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 FDA6 (**13**) [radical de tipo T= R-I]

La síntesis del compuesto FDA6 (**13**) se describe en la Figura 1. Comienza con la nitración del ácido 2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-carboxílico (**2**), preparado conforme el procedimiento de Schlosser (*Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 691-695) a partir del compuesto **1**, para dar una mezcla de los derivados nitrados en *meta* y *para* respecto del grupo carboxilato, a partir de la que separa por cristalización el compuesto **3**. Este compuesto es hidrogenado en condiciones estándar para dar la anilina **4**, que es transformada en el yoduro **5** a través de una reacción de diazotación con ácido nitroso, seguida de tratamiento *in situ* de la sal de diazonio formada con yoduro potásico. La transformación del grupo carboxilato de **5** en el grupo formilo se efectúa en dos etapas, primero reducción del grupo carboxilato a hidroximetilo con diborano, seguido de reoxidación con el periodinano de Dess-Martin. La reacción de Wittig del aldehído formado **7** con (cianometileno)trifenilfosforano procede suavemente para proporcionar el nitrilo α - β -insaturado **8** como una mezcla de isómeros *cis/trans*. La elaboración final del anillo de pirrol se lleva a cabo tratando esta mezcla con TosMIC en medio básico, obteniéndose el derivado pirrólico **9** con rendimiento moderado. Una vez completado el esqueleto bicíclico característico de fludioxonil se lleva a cabo la incorporación de la cadena hidrocarbonada carboxilada que constituye el brazo espaciador, utilizando una reacción de acoplamiento de Sonogashira entre el yoduro **9** y el alquino-éster **10**, catalizada por Pd(0). La síntesis del compuesto FDA6 (**13**) se completa mediante una reacción de hidrogenación del triple enlace del alquino obtenido **11**, seguido de hidrólisis ácida de grupo éster *tert*-butílico.

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

i) *Preparación del ácido 2,2-difluoro-6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-4-carboxílico (3)*. El ácido 2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-carboxílico (**2**, 1.8 g, 8.9 mmol) se suspendió en H₂SO₄ concentrado (20 mL) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo. A continuación se añadió gota a gota una mezcla de HNO₃ fumante y H₂SO₄ concentrado (4 mL) desde un embudo de adición y la mezcla resultante se agitó a 0°C por 3 h y se vertió sobre hielo picado (aproximadamente 300 g). El precipitado amarillo formado se recogió por filtración a vacío, se lavó con agua fría y se secó a vacío bajo P₂O₅ obteniendo una mezcla de los ácidos regioisoméricos 2,2-difluoro-5-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-4-carboxílico y 2,2-difluoro-7-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-4-carboxílico (**3**) (1.91 g, correspondiente a un rendimiento combinado del 87 %). El compuesto **3** se purificó por cristalización de la mezcla de regioisómeros de hexano-éter (844 mg, 49 %). Pf 201.1–203.4 °C (cristalizado de Et₂O-hexano). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3119, 1874, 1707, 1658, 1235, 1171. RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 8.61 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.34 (1H, d, *J* = 2.3 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 163.7 (C), 148.9 (C), 146.2 (C), 145.3 (C), 133.7 (t, *J* = 255 Hz, C), 123.0 (CH), 116.3 (C), 110.2 (CH). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₈H₂F₂NO₆ [M-H]⁺ 245.9843, encontrado 245.9850.

ii) *Preparación del ácido 6-amino-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-carboxílico (4)*. El compuesto **3** (1.36 g, 5.5 mmol) se disolvió en EtOH (45 mL) bajo atmósfera de N₂. El catalizador, 10% Pd/C (150 mg), se suspendió en AcOEt (5 mL) y se añadió a la mezcla de reacción. El matraz se purgó con H₂ y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 1 h bajo atmósfera de H₂ (globo). La mezcla de reacción se filtró a través de una pequeña capa de celite, que se lavó con AcOEt. La eliminación de los disolventes a vacío proporcionó **4** (1.2 g, 100%) como un sólido parduzco. Pf 227–230 °C. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3426, 1585, 1395, 1254. RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 6.93 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.73 (1H, d, *J* = 2.3 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 166.3 (C), 146.3 (C), 146.2 (C), 137.5 (C), 133.3 (t, *J* = 251 Hz, C), 116.1 (C), 110.7 (CH), 102.2 (CH). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₈H₆F₂NO₄ [M+H]⁺ 218.0265, encontrado 218.0260.

iii) *Preparación del ácido 2,2-difluoro-6-iodobenzo[d][1,3]dioxol-4-carboxílico (5)*. Una disolución de NaNO₂ (953 mg, 13.81 mmol, 2.5 eq) en agua (7 mL) se añadió gota a gota durante 45 minutos sobre una suspensión de **4**

(1.2 g, 5.5 mmol) en una mezcla 1:1 de H₂O y HCl concentrado (35 mL) enfriada en un baño de hielo. La mezcla se agitó por un tiempo adicional de 30 min en el baño de hielo y luego se vertió sobre una disolución de KI (5.5 g, 33.13 mmol, 6 eq) en agua (50 mL). La mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y entonces se añadieron pequeñas porciones de NaHSO₃ hasta que la mezcla se tornó naranja pálido. La suspensión resultante amarillenta se filtró a vacío y el sólido recogido se lavó con agua y se secó a vacío bajo P₂O₅ obteniéndose el compuesto **5** (1.38 g, 76%). Pf 194.1–196.6°C. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1701, 1474, 1221, 1055. RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 8.00 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 7.80 (1H, d, *J* = 1.7 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 164.2 (C), 146.3 (C), 144.8 (C), 135.4 (CH), 133.1 (t, *J* = 251 Hz, C), 123.6 (CH), 117.8 (C), 85.3 (C). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₈H₂F₂IO₄ [M-H]⁺ 326.8986, encontrado 326.8983.

iv) Preparación del (2,2-difluoro-6-iodobenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)metanol (**6**). Una disolución 1M del complejo BH₃-THF en THF (2.8 mL, 2.8 mmol, 2 eq) se añadió gota a gota durante 15 minutos sobre una disolución del compuesto **5** (453 mg, 1.38 mmol) en THF anhidro (3 mL) bajo atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y entonces se añadió una disolución acuosa 2M de HCl (3 mL) y la mezcla resultante se extrajo con CH₂Cl₂, las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a vacío. El residuo se purificó por cromatografía, usando CH₂Cl₂-MeOH 40:1 como eluyente obteniendo el alcohol **6** (421 mg, 97%) como un sólido blancuzco. Pf 69.5–69.7 °C. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3434, 1474, 1237, 1158, 1038. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.45 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 4.66 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 2.97 (1H, t, *J* = 5.8 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 143.8 (C), 140.9 (C), 131.4 (C), 131.3 (t, *J* = 257 Hz, C), 125.0 (C), 117.7 (CH), 84.8 (C), 58.2 (CH₂). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₈H₅F₂IO₃ 313.9252, encontrado 313.9263.

v) Preparación del 2,2-difluoro-6-iodobenzo[d][1,3]dioxol-4-carbaldehído (**7**). Perdiodinano de Dess-Martin (760 mg, 1.79 mmol, 1.5 eq) se añadió bajo atmósfera de N₂ a una disolución del alcohol **6** (38 mg, 1.21 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (4 mL) enfriada a 0 °C. El matraz de reacción se cubrió con una hoja de papel de aluminio para protegerlo de la luz y se añadió piridina (357 μ L, 3.1 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0°C y 1.5 horas a temperatura ambiente, se diluyó con CH₂Cl₂ (100 mL), se lavó con una mezcla 1:1 de una disolución saturada de NaHCO₃ y una disolución acuosa al 10% de Na₂S₂O₃, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía sobre gel de sílice, usando CH₂Cl₂-MeOH 40:1 como eluyente, obteniéndose el aldehído **7** (333 mg, 88%) como un sólido blanquecino. Pf 55–57°C. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1698, 1474, 1257, 1186, 991, 858. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 10.08 (1H, s), 7.89 (1H, d, *J* = 1.7 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 1.7 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 184.4 (C), 145.0 (C), 131.7 (CH), 131.9 (t, *J* = 263 Hz, C), 128.4 (C), 123.2 (CH), 120.8 (C), 84.9 (C). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₈H₃F₂IO₃ 311.9095, encontrado 311.9112.

vi) Preparación del 3-(2,2-difluoro-6-iodobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)acrilonitrilo (**8**): (Cianometileno)trifenilfosforano (580 mg, 1.93 mmol, 2.4 eq) se añadió bajo atmósfera de N₂ a una disolución del aldehído **7** (246 mg, 0.80 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y el disolvente orgánico se eliminó a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía, usando CH₂Cl₂-MeOH 40:1 como eluyente, obteniéndose un sólido blanco consistente en una mezcla 45:55 de los isómeros *trans* y *cis* del compuesto **8** (266 mg, 99%). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3434, 1466, 1247, 1162. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.17 (0.45H, dd, *J* = 1.5, 0.5 Hz, isómero *trans*), 7.40-7.46 (1.55H, m, isómeros *cis* y *trans*), 7.20 (0.45H, dd, *J* = 16.8, 0.5 Hz, isómero *trans*), 7.12 (0.55H, dd, *J* = 12.1, 0.5 Hz, isómero *cis*), 6.13 (0.45H, d, *J* = 16.8 Hz, isómero *trans*), 5.68 (0.55H, d, *J* = 12.1 Hz, isómero *cis*). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₁₀H₄F₂INO₂ 334.9255, encontrado 334.9250.

vii) Preparación del 4-(2,2-difluoro-6-iodobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carbonitrilo (**9**). Una disolución de TosMIC (376 mg, 1.92 mmol, 2 eq) en THF anhidro (1 mL) y otra de *t*-BuOK (216 mg, 1.92 mmol, 2 eq.) en THF (1 mL) se añadieron sucesivamente bajo nitrógeno sobre una disolución de la mezcla de nitrilos insaturados isoméricos **8** (323 mg, 0.96 mmol) en THF (2.5 mL) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a la misma temperatura y posteriormente 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se vertió sobre hielo-agua y se extrajo con AcOEt, los extractos orgánicos se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro. El residuo sólido obtenido tras la evaporación del disolvente se suspendió en CH₂Cl₂ (5 mL) y la suspensión resultante se sonicó durante 1 minuto. La suspensión resultante se filtró a vacío y el sólido recogido se purificó por cromatografía, utilizando CH₂Cl₂-MeOH 100:1 como eluyente, obteniéndose **9** (185.4 mg, 51%) como un sólido ligeramente parduzco que se descompone cuando se calienta a 145°C. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3260, 2226, 1638, 1257, 1226, 1161. RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 7.94 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.28 (1H, d, *J* = 2.1 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 145.5 (C), 141.0 (C), 132.6 (t, *J* = 255 Hz, C), 131.5 (CH), 130.0 (CH), 121.8 (CH), 120.2 (C), 117.8 (CH), 117.4 (C), 117.3 (C), 91.6 (C), 86.3 (C). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₁₂H₄F₂IN₂O₂ [M-H]⁺ 372.9286, encontrado 372.9292.

viii) Preparación del 6-(7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3] dioxol-5-il)hex-5-inoato de *tert*-butilo (**11**). Et₃N anhidra (1.2 mL) se añadió gota a gota sobre una mezcla del ioduro alílico **9** (113 mg, 0.30 mmol),

hex-5-inoato de *terc*-butilo (**10**) (76 mg, 0.45 mmol, 1.5 eq), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (6.4 mg, 3% mol), y CuI (0.6 mg, 1% mol) en DMF anhidra (1.2 mL) bajo nitrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una disolución acuosa de LiCl al 2% y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. La purificación cromatográfica del residuo sobre gel de sílice, usando CH₂Cl₂-MeOH 80:1 como eluyente, proporcionó el compuesto **11** (108 mg, 87%) como un aceite incoloro. IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3284, 2978, 2226, 1720, 1427, 1241, 1152. RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 7.64 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.56 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.27 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.08 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 2.47 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.41 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.85 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz), 1.45 (9H, s). RMN de ¹³C (75 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 174.4 (C), 145.0 (C), 140.6 (C), 132.9 (t, *J* = 254 Hz, C), 129.9 (CH), 126.4 (CH), 121.7 (C), 121.6 (CH), 118.4 (C), 118.2 (C), 117.6 (C), 111.6 (CH), 91.7 (C), 90.4 (C), 81.7 (C), 80.8 (C), 35.3 (CH₂), 28.4 (CH₃), 25.2 (CH₂), 19.4 (CH₂). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₂₂H₁₉F₂N₂O₄ [M-H]⁺ 413.1313, encontrado 413.1307.

ix) Preparación del 6-(7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)hexanoato de *terc*-butilo (12**).** Una mezcla del alquino **11** (80 mg, 0.193 mmol) y PtO₂ (6.6 mg, 15% mol) en EtOH (3 mL) se purgó bajo una atmósfera de hidrógeno gas. A continuación, la presión de H₂ se reguló a 35 psi y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se diluyó con AcOEt (5 mL), se filtró a través de una capa de gel de sílice que se lavó con AcOEt y los disolventes orgánicos se eliminaron a vacío proporcionando el éster **12** (84 mg, 98%) como un aceite. IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3283, 2933, 2224, 1724, 1367, 1235, 1151. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.47 (1H, s), 7.47 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.40 (1H, m), 7.28 (1H, m), 6.79 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 2.64 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.21 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.62 (4H, m), 1.42 (9H, s), 1.35 (2H, m). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.5 (C), 143.8 (C), 139.1 (CH), 138.1 (C), 131.5 (t, *J* = 254 Hz, C), 127.6 (CH), 121.0 (CH), 119.6 (CH), 118.6 (C), 116.6 (C), 115.8 (C), 107.9 (C), 91.6 (C), 80.2 (C), 35.6 (CH₂), 35.5 (CH₂), 31.1 (CH₂), 28.38 (CH₂), 28.0 (CH₃), 24.9 (CH₂). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₂₂H₂₃F₂N₂O₄ [M-H]⁺ 417.1626, encontrado 417.1621.

x) Preparación del ácido 6-(7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)hexanoico (FDa6). Una disolución del éster *terc*-butilico **12** (85 mg, 0.20 mmol) en ácido fórmico puro (2.7 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El ácido fórmico se eliminó a presión reducida, el residuo obtenido se disolvió en benceno y la mezcla se concentró de nuevo a sequedad. El residuo se disolvió en cloroformo (10 mL) y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose el compuesto FDa6 (**13**) (64 mg, 0.18 mmol, 88%) como un sólido blanquecino. Pf 153.9–154.4 °C. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3389, 1719, 1256, 1139. RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 7.54 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.45 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 7.25 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 1.6 Hz), 2.66 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.29 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.39 (2H, m), 1.64 (4H, m). RMN de ¹³C (75 MHz, MeOH-d₄) δ (ppm): 177.7 (C), 145.2 (C), 140.8 (C), 139.2 (C), 132.9 (t, *J* = 252.5 Hz, C), 129.6 (CH), 122.4 (CH), 121.2 (CH), 119.2 (C), 118.0 (C), 117.8 (C), 108.8 (CH), 91.6 (C), 36.6 (CH₂), 34.9 (CH₂), 32.3 (CH₂), 29.7 (CH₂), 25.9 (CH₂). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₁₈H₁₅F₂N₂O₄ [M-H]⁺ 361.1000, encontrado 361.0995.

40 Ejemplo 2: Síntesis de FDC6 (**19**) [radical de tipo T= R-II]

La síntesis del compuesto FDC6 (**19**) se describe en la Figura 2. Para su preparación se parte de fludioxonil y se inicia con la reducción del grupo nitrilo a formilo para obtener el aldehído **14**, que es oxidado con clorito sódico al ácido carboxílico **15**, el cual es transformado en la amida **18** por reacción con el amino éster **17**, previa activación del grupo carboxilato a través de su transformación en el correspondiente éster de succinimidilo. La síntesis de FDC6 (**19**) finaliza con la hidrólisis del grupo éster metílico de **18** con LiOH en medio acuoso.

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

i) Preparación del 4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carbaldehído (14**).** Una disolución 1M de DIBAL-H en tolueno (2.3 mL, 2.3 mmol) se añadió gota a gota sobre otra disolución de fludioxonil (400 mg, 1.61 mmol) en Et₂O anhidro (20 mL) a -60°C bajo N₂. La mezcla de reacción se agitó mientras se dejaba calentar a -30 °C en el transcurso de 1 hora y una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo a la misma 30 minutos adicionales, entonces el baño frío se retiró y la reacción se agitó durante 1 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se transfirió vía cánula sobre una suspensión de gel de sílice (1.8 g) en agua (0.7 mL) enfriada a 0°C, y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 1 h y luego a temperatura ambiente por 1 hora adicional. Se añadieron K₂CO₃ (2.68 g) y MgSO₄ (2.68 g) sólidos y la agitación se continuó por otra hora, la mezcla se filtró a vacío y el filtrado y el disolvente de lavado se concentraron a sequedad dando lugar al aldehído **14** (371 mg, 92%) como un sólido, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Pf 143.7-146.1 °C. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3281, 3924, 1659, 1453, 1317, 1233, 1133, 1099, 1050, 762, 716. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.93 (1H, s), 8.88 (1H, s ancho), 7.56 (1H, dd, *J* = 3.2, 2.2 Hz), 7.44 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz), 7.17 (1H, dd, *J* = 2.2, 2.2 Hz), 7.12 (1H, dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz), 6.99 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz). RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ

(ppm): 185.6 (CH), 143.7 (C), 140.9, 131.4 (t, $J = 254$ Hz, C), 128.5 (CH), 125.0 (CH), 123.8 (C), 123.4 (CH), 121.0 (CH), 117.4 (C), 117.2 (C), 107.9 (CH). EMAR (TOF-MS) m/z : calculado para $C_{12}H_8F_2NO_3$ [$M^+ + H$] 252.0472, encontrado 252.0478.

5 ii) *Preparación del ácido 4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carboxílico (15)*. Una disolución de $NaClO_2$ (800 mg, 8.84 mmol) y $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (1.129 g, 1.18 mmol) en agua (3.2 mL) y 2-metil-2-buteno (836 mg, 1.26 mL 11.92 mmol) se añadieron sucesivamente a una disolución de **14** (318.6 mg, 1.27 mmol) en *tert*-BuOH (2.5 mL) enfriada a 0°C. El matraz de reacción se cerró herméticamente y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con EtO_2 . La fase etérea se extrajo con una solución 1M de NaOH y se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ anhidro y se concentró dando lugar al aldehído de partida sin reaccionar **14** (29.9 mg, 9.4%). La capa acuosa se acidificó a pH 4-5 con ácido cítrico y se extrajo con EtO_2 . Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se concentraron a sequedad a vacío dando lugar al ácido **15** [268.1 mg, 84% (93% basado en el material de partida recuperado)] como un sólido con una pureza suficiente para ser utilizado en la siguiente etapa sin necesidad de purificación. Pf 188.0-189.0 °C. IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3500-2500, 3126, 2885, 1668, 1535, 1454, 1241, 1156, 780, 578. RMN de 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 11.84 (1H, s ancho), 11.65 (1H, s ancho), 7.47 (1H, dd, $J = 2.7, 2.4$), 7.25-7.14 (3H, m), 7.02 (1H, t, $J = 2.4, 2.4$). RMN de ^{13}C (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 165.1 (C), 142.4 (C), 140.6 (C), 130.9 (t, $J = 251$ Hz, C), 125.5 (CH), 125.4 (CH), 123.3 (C), 120.1 (CH), 119.3 (C), 116.4 (C), 113.8 (C), 107.5 (CH). EMAR (TOF-MS) m/z : calculado para $C_{12}H_7F_2NO_4$ [$M^+ - H$] 266.0265, encontrado 266.0269.

iii) *Preparación del 6-(4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carboxamido)hexanoato de metilo (18)*. Et_3N anhidra (409 μL , 297 mg, 2.93 mmol) se añadió a una disolución del ácido **15** (206.5 mg, 0.773 mmol) y carbonato de *N,N*-disuccinimidilo (DSC, 257 mg, 1.00 mmol) en CH_3CN anhidro (7 mL) a 0°C bajo nitrógeno y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 2 h. El disolvente y el exceso de Et_3N se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de columna, eluyendo primero con CH_2Cl_2 y luego con $CHCl_3$, dando lugar al éster de succinimidilo intermedio **16** (250.6 mg, 89%). RMN de 1H (300 MHz, $CHCl_3$) δ (ppm): 9.59 (1H, s ancho), 7.65 (1H, dd, $J = 3.3, 2.1$), 7.21 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz), 7.02 (1H, dd, $J = 8.1, 8.1$ Hz), 7.00 (1H, dd, $J = 3.3, 1.5$ Hz), 6.94 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz), 2.86 (4H, s).

Una disolución del hidrocloreuro del 6-amino-hexanoato metilo (**17**) (152.6 mg, 0.84 mmol) y Et_3N (129 μL , 93.5 mg, 0.924 mmol) en DMF anhidra (4 mL) se añadió a una solución del éster de succinimidilo **16** obtenido anteriormente (102 mg, 0.280 mol) en DMF (0.5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 4 h, se diluyó con agua y se extrajo con Et_2O . Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una solución acuosa al 2% de LiCl y salmuera y se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro. La purificación cromatográfica del residuo que quedó después de la evaporación del disolvente, utilizando $CHCl_3$ como eluyente, proporcionó la amida **18** (99.5 mg, 90%) como un aceite. IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3335, 3131, 2947, 1736, 1653, 1603, 1561, 1458, 1239, 1144, 1110, 771, 726. RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.92 (1H, s ancho), 7.32 (1H, dd, $J = 2.3, 2.3$ Hz), 7.15 (1H, dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz), 7.06 (1H, dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz), 6.96 (1H, dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz), 6.90 (1H, dd, $J = 2.4, 2.4$ Hz), 5.66 (1H, t ancho, $J = 5.5$ Hz), 3.64 (3H, s), 3.30 (2H, dd, $J = 12.9, 7.0$ Hz), 2.26 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.59 (2H, t, quint, $J = 7.4$ Hz), 1.45 (2H, m), 1.24 (2H, m). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 174.1 (C), 165.7 (C), 143.7 (C), 141.0 (C), 131.3 (t, $J = 252$ Hz, C), 124.7 (CH), 123.5 (CH), 122.4 (C), 119.7 (CH), 118.3 (C), 118.2 (C), 114.6 (C), 107.7 (CH), 51.5 (CH_3), 39.3 (CH_2), 33.8 (CH_2), 29.1 (CH_2), 26.3 (CH_2), 24.5 (CH_2). EMAR (TOF-MS) m/z : calculado para $C_{19}H_{20}F_2N_2O_5$ [$M^+ - H$] 393.1262, encontrado 393.1258.

iv) *Preparación del ácido 6-(4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carboxamido)hexanoico (FDc6)*. Una solución del éster metílico **18** (112.5 mg, 0.285 mmol) en una mezcla de THF (2.3 mL) y H_2O (0.95 mL) se trató con $LiOH \cdot H_2O$ (120.4 mg, 2.869 mmol) y se agitó a temperatura ambiente por 2.5 h. La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (20 mL) y se extrajo con éter etílico. La capa orgánica se descartó y la capa acuosa se evaporó bajo vacío para eliminar los restos de disolvente orgánico, después se enfrió en un baño de hielo y se acidificó con una solución acuosa saturada de $KHSO_4$ hasta aproximadamente pH 3. El precipitado formado se filtró, se lavó con agua y se secó para dar el compuesto FDc6 (**19**) (96 mg, 88%) como un semisólido. IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3500-2500, 2936, 1712, 1654, 1605, 1544, 1453, 1235, 1149, 723. RMN de 1H (300 MHz, $THF-d_8$) δ (ppm): 10.7 (1H, s ancho), 7.42 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz), 7.17 (1H, dd, $J = 2.7, 2.4$ Hz), 7.04 (1H, dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz), 6.98-6.94 (2H, a dd solapado con otro dd de $J = 8.1, 1.2$ Hz), 6.83 (1H, t ancho, $J = 5.7$ Hz), 3.25 (2H, dd, $J = 12.9, 6.9$ Hz), 2.21 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.53 (4H, m), 1.35 (2H, m). RMN de ^{13}C (75 MHz, $THF-d_8$) δ (ppm): 174.7 (C), 165.9 (C), 144.4 (C), 141.6 (C), 132.5 (t, $J = 253$ Hz, C), 126.3 (CH), 124.0 (CH), 122.1 (CH), 120.8 (C), 120.6 (CH), 120.4 (C), 116.2 (C), 107.3 (CH), 40.0 (CH_2), 34.3 (CH_2), 30.6 (CH_2), 27.7 (CH_2), 25.8 (CH_2). EMAR (TOF-MS) m/z : calculado para $C_{18}H_{19}F_2N_2O_5$ [$M^+ + H$] 381.1262, encontrado 381.1260.

Ejemplo 3: Síntesis de FDn6 (**22**) [radical de tipo T= R-III]

5 La síntesis del compuesto FDn6 (**22**) se describe en la Figura 3. Se utiliza fludioxonil como material de partida e implica una reacción de alquilación del nitrógeno pirrólico para formar el éster **21**, transformación que se lleva a cabo por tratamiento de fludioxonil con HNa y el bromo-éster **20**, seguido de hidrólisis del grupo éter *terc*-butilico de **21** que proporciona directamente FDn6 (**22**).

10 A continuación se ilustran los detalles de la preparación y caracterización de este compuesto de fórmula general (I).

15 *i) Preparación del 6-(3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-il)hexanoato de terc-butilo (21).* Una disolución de fludioxonil (93.4 mg, 0.38 mmol) en DMF seca (0.4 mL) se añadió lentamente bajo nitrógeno sobre una suspensión de NaH prelavado con pentano (33 mg de una suspensión del 60% en aceite mineral, 0.82 mmol) en DMF (0.3 mL). Después de agitar a 2 h a temperatura ambiente, se añadió una disolución de NaI (15.2 mg, 0.10 mmol) y 6-bromohexanoato de *terc*-butilo (**20**, 142 mg, 0.56 mmol) en DMF (0.6 mL) y la mezcla se agitó por un periodo de 3 h, se vertió sobre agua y se extrajo con éter etílico. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una disolución acuosa al 2% de LiCl y salmuera y se secaron sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a vacío y el residuo se cromatografió en gel de sílice, usando mezclas de hexano-AcOEt (dese 100:0 a 80:20) como eluyente, dando lugar al éster **21** (126 mg, 80%) como un aceite. IR (NaCl) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3129, 2977, 2937, 2222, 1720, 1651, 1552, 1527, 1455, 1244, 1152, 1033, 920, 763, 721. RMN de ¹H (300 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 7.70 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz), 7.25 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.14 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.12 (1H, dd, *J* = 8.1, 8.1 Hz), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz), 3.95 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.22 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.84 (2H, quint, *J* = 7.4 Hz), 1.63 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz), 1.42 (9H, s), 1.35 (2H, m). RMN de ¹³C RMN de (75 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 172.6 (C), 143.7 (C), 139.7 (C), 131.3 (t, *J* = 255 Hz, C), 129.5 (CH), 124.0 (CH), 122.3 (CH), 121.2 (CH), 118.5 (C), 116.5 (C), 116.4 (C), 107.7 (CH), 91.0 (C), 80.2 (C), 50.4 (CH₂), 35.1 (CH₂), 30.7 (CH₂), 28.0 (CH₃), 25.8 (CH₂), 24.3 (CH₂). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₂₂H₂₅F₂N₂O₄ [M+H]⁺ 419.17824, encontrado 419.17864.

20 *ii) Preparación del ácido 6-(3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-il)hexanoico (FDn6).* El éster *terc*-butilico **21** (87 mg, 0.021 mmol) se disolvió en ácido fórmico (2 mL) a 0°C y la disolución resultante se agitó a 0-4°C durante 30 min. La mezcla se diluyó con benceno y se concentró a sequedad (temperatura del baño no superior a 40°C). El residuo obtenido se disuelve en benceno y la mezcla se concentra de nuevo a sequedad, obteniéndose el compuesto FDn6 (**22**) (72 mg, 96%) como un sólido blanco. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3500-2500, 3136, 2943, 2220, 1705, 1549, 1525, 1258, 1133, 762, 718. RMN de ¹H (300 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 11.2 (1H, s ancho), 7.71 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz), 7.24 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.15 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.13 (1H, dd, *J* = 8.1, 8.1 Hz), 6.96 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz), 3.97 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 2.39 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.87 (2H, quint, *J* = 7.3 Hz), 1.70 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz), 1.39 (2H, m). RMN de ¹³C (75 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 179.4 (C), 143.8 (C), 139.7 (C), 131.3 (t, *J* = 255 Hz, C), 129.5 (CH), 124.0 (CH), 122.3 (CH), 121.2 (CH), 118.6 (C), 116.5 (C), 116.4 (C), 107.7 (CH), 91.0 (C), 50.4 (CH₂), 33.6 (CH₂), 30.6 (CH₂), 25.8 (CH₂), 23.9 (CH₂). EMAR (TOF-MS) *m/z*: calculado para C₁₈H₁₇F₂N₂O₄ [M+H]⁺ 363.1156, encontrado 363.1151.

1.2. Activación de los compuestos de fórmula (I)

45 Los ejemplos de compuestos de fórmula (I) aquí presentados contienen un grupo carboxilo como grupo químico funcional para su conjugación a proteínas portadoras, concretamente por reacción con los grupos amino libres de la proteína. El grupo carboxilo se activó 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) 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 Et₃N y se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La disolución se diluyó en cloroformo, se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ y salmuera y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Después de evaporar el disolvente, el residuo restante se purificó por cromatografía en columna, usando cloroformo como eluyente, obteniéndose el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo del compuesto de fórmula (I) en forma pura.

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

Tampones y disoluciones:

60 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) sorbitan monolaurato (conocido como Tween 20);

CB: Tampón carbonato sódico 50 mM, pH 9.6;
 Disolución de lavado: NaCl 150 mM conteniendo 0.05% (v/v) de Tween 20.

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

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

1.3.1. Compuestos de fórmula (II) donde P es BSA

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 2 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 14, 15 y 17 para FDa6, FDc6 y FDN6, respectivamente.

1.3.2. Compuestos 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 200 μL de una disolución 34 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 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 y 8 moléculas para FDa6, FDc6 y FDN6, respectivamente.

1.3.3. Compuestos 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 μL de una disolución 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 2 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 6, 2 y 4 para FDa6, FDc6 y FDN6, respectivamente.

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) disueltos 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 $\frac{1}{2}$ 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, EE.UU.). La

actividad peroxidasa usada como marcador se reveló con 100 μL por pocillo de una disolución 2 mg/mL de *o*-fenilendiamina en tampón citrato 25 mM, fosfato 62 mM, 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, EE.UU.). 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, EE.UU.). 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 (IC_{50}) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $1/10^4$ 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 μL 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 inmunoquímica se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron las placas. Finalmente, se reveló la actividad peroxidasa retenida y se leyó la absorbancia a 492 nm como se ha descrito.

4. Resultados

4.1. Respuesta inmune

Los tres inmunógenos produjeron respuestas inmunes semejantes y equivalentes, con títulos entorno a 3×10^4 (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 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 competidor diferentes concentraciones de fludioxonil preparadas por dilución seriada. Un anticuerpo procedente de un animal inmunizado con un inmunógeno de FDa6 (rFDa6#2) y un animal inmunizado con uno de FDn6 (rFDn6#1) produjeron anticuerpos cuyos ensayos presentaron una buena sensibilidad para fludioxonil. En cambio los anticuerpos obtenidos a partir del inmunógeno de FDC6 presentaron una muy baja afinidad por fludioxonil. Este resultado confirma que unas estructuras son más idóneas que otras para el objetivo que se persigue y demuestra la dificultad para predecir la posición óptima de funcionalización de los compuestos de fórmula (I). Los valores de la señal máxima, de la IC_{50} y de la pendiente de la curva de inhibición resultante para cada anticuerpo con antígeno de ensayo homólogo y heterólogo se han incluido en las Tablas 1 (a-c) y las Tablas 2 (a-c).

Como se desprende de los resultados obtenidos en los ejemplos ilustrados, los inmunógenos preparados con los compuestos de fórmula (I) con radical R-I o R-III proporcionaron anticuerpos de mayor afinidad para fludioxonil. Por el contrario, el inmunógeno con radical de tipo R-II proporcionó anticuerpos de menor afinidad hacia dicho fungicida.

ES 2 461 415 B1

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

Tabla 1a

OVA-FDa6					
Anticuerpo	Conjugado ($\mu\text{g/mL}$)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rFDa6#1	0.1	30	0.85	0.58	653.7
rFDa6#2	0.1	30	1.21	0.61	24.0
rFDc6#1	1.0	10	1.03	0.41	225.5
rFDc6#2	1.0	3	1.12	0.81	1467.1
rFDn6#1	1.0	3	----	----	----
rFDn6#2	1.0	10	0.81	0.60	899.4

Tabla 1b

OVA-FDc6					
Anticuerpo	Conjugado ($\mu\text{g/mL}$)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rFDa6#1	1.0	3	----	----	----
rFDa6#2	1.0	10	1.01	1.07	48.5
rFDc6#1	0.1	300	1.13	0.68	1405.7
rFDc6#2	0.1	100	0.81	0.58	1329.4
rFDn6#1	1.0	3	----	----	----
rFDn6#2	1.0	3	----	----	----

Tabla 1c

OVA-FDn6					
Anticuerpo	Conjugado ($\mu\text{g/mL}$)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rFDa6#1	1.0	3	----	----	----
rFDa6#2	0.1	3	1.02	0.90	98.9
rFDc6#1	1.0	10	0.90	0.55	88.1
rFDc6#2	1.0	10	0.77	----	----
rFDn6#1	0.1	30	1.14	0.53	73.2
rFDn6#2	0.1	100	0.86	0.38	92.4

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

Tabla 2a

Anticuerpo	HRP-FDa6				
	Trazador (ng/mL)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rFDa6#1	10	3	1.04	0.65	75.0
rFDa6#2	3	10	0.82	0.82	100.6
rFDc6#1	100	3	1.18	0.52	296.9
rFDc6#2	100	3	0.59	0.65	436.2
rFDn6#1	100	3	----	----	----
rFDn6#2	100	3	0.78	0.93	118.3

Tabla 2b

Anticuerpo	HRP-FDc6				
	Trazador (ng/mL)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rFDa6#1	100	3	----	----	----
rFDa6#2	100	3	----	----	----
rFDc6#1	3	3	1.07	----	----
rFDc6#2	10	3	1.75	----	----
rFDn6#1	100	3	----	----	----
rFDn6#2	100	3	----	----	----

Tabla 2c

Anticuerpo	HRP-FDn6				
	Trazador (ng/mL)	Título Ac. ($\times 10^3$)	A_{max}	Pendiente	IC_{50} (nM)
rFDa6#1	100	3	----	----	----
rFDa6#2	10	3	1.11	0.75	36.4
rFDc6#1	100	3	0.75	0.57	77.6
rFDc6#2	100	3	----	----	----
rFDn6#1	3	10	0.78	0.61	16.7
rFDn6#2	3	3	1.00	0.57	454.6

5

En la Figura 6 se muestra la curva de inhibición obtenida en el formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa cuando el pocillo se tapizó con 100 μ L de una dilución del anticuerpo rFDn6#1 a $1/10^4$ y en la etapa competitiva se usó 0.3 ng de compuesto homólogo de fórmula (II) donde P es HRP que es un trazador enzimático.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):

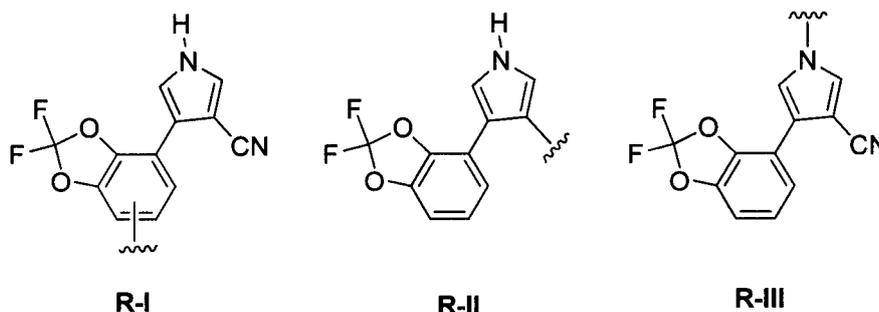
5



caracterizado porque

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

10



donde

R-I se selecciona del grupo que consiste en

[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],

15

[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y

[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

R-II es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

R-III es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

20

L es una cadena hidrocarbonada de 0 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; e

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

con la condición de que:

25

a) cuando T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo], L es una cadena lineal hidrocarbonada de 2 a 40 átomos de carbono,

b) cuando T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo] e Y es COOH, L es una cadena hidrocarbonada de 4 a 40 átomos de carbono,

30

c) cuando T es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo] e Y es COOH, L es una cadena hidrocarbonada de 1 a 40 átomos de carbono.

2. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, caracterizado porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

35

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, -C≡CH, -NH₂ y -SH.

4. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque T se selecciona del grupo que consiste en

40

[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],

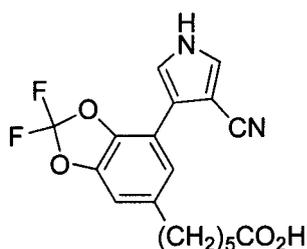
[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y

[7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

45

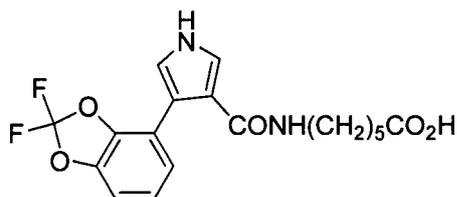
L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 8 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; e Y se selecciona dentro del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -C≡CH, -NH₂ y -SH.

5. Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 4, caracterizado porque es



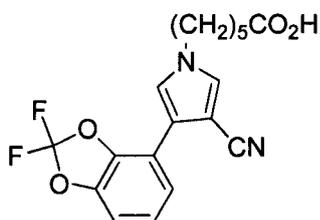
6. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque T es [4-(2,2-difluorobenzodioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo]; L es una cadena hidrocarbonada lineal de 1 a 8 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; e Y se selecciona dentro del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -C≡CH, -NH₂ y -SH.

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

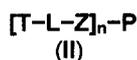


8. Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzodioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo]; L es una cadena hidrocarbonada lineal de 4 a 8 átomos de carbono y dicha cadena comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N; e Y se selecciona dentro del grupo que consiste en -COOH, -CHO, -C≡CH, -NH₂ y -SH.

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

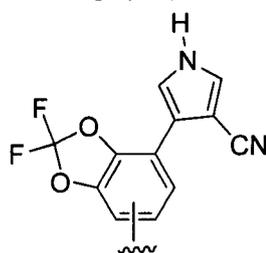


10. Un compuesto de fórmula (II):

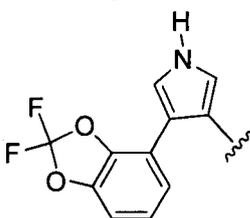


caracterizado porque

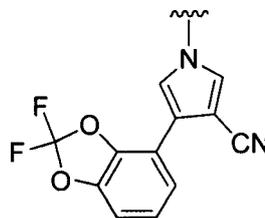
T se selecciona del grupo que consiste en R-I, R-II y R-III;



R-I



R-II



R-III

donde

R-I se selecciona del grupo que consiste en

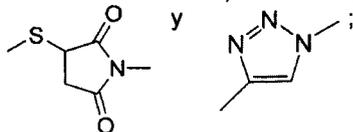
[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzodioxol-5-ilo], [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzodioxol-5-ilo] y [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzodioxol-4-ilo];

R-II es [4-(2,2-difluorobenzodioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

R-III es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzodioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

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

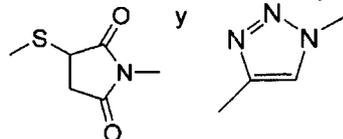
Z es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NHCONH-, -NHCSNH-, -OCONH-, -NHOCO-, -OCSNH-, -SCONH-, -S-, -S-S-, -NH(C=NH)-, -OCO-, -CO-, -CHOH-, -N=N-, -NH-, -NR-,



P es un polipéptido natural o sintético de peso molecular mayor de 2000 daltons; y n es un número con un valor entre 1 y 500.

11. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 10, caracterizado porque L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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



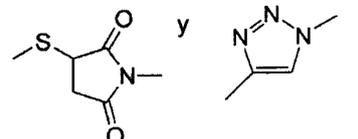
13. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque P se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

14. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque T se selecciona del grupo que consiste en

[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo], [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

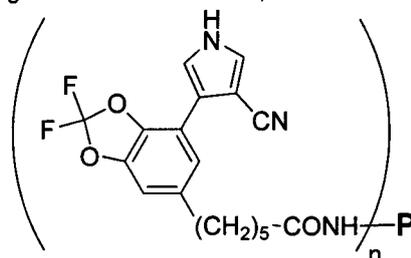
L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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.

15. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 14, caracterizado porque es

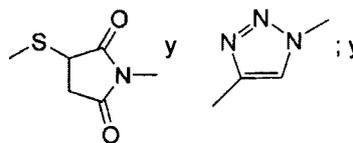


donde P se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa, y n es un valor seleccionado entre 1 y 50.

16. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque T es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

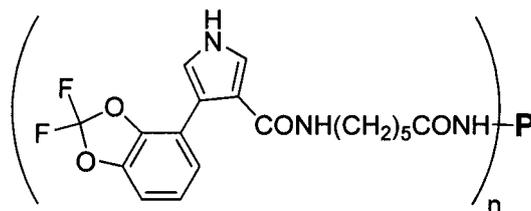
Z se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



5

P se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

10 17. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 16, caracterizado porque es



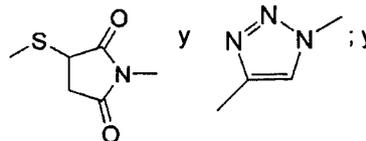
donde P se selecciona del grupo que consiste en albúmina y peroxidasa, y n es un valor seleccionado entre 1 y 50.

15

18. Un compuesto de fórmula (II) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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

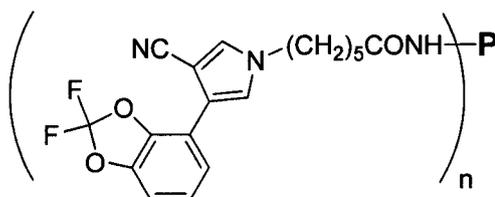


25

P se selecciona del grupo que consiste en albúmina, tiroglobulina, hemocianina, β -galactosidasa, peroxidasa, fosfatasa y oxidasa.

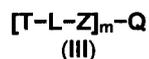
19. Un compuesto de fórmula (II) según la reivindicación 18, caracterizado porque es

30



donde P se selecciona del grupo que consiste en albúmina o peroxidasa y n es un valor seleccionado entre 1 y 50.

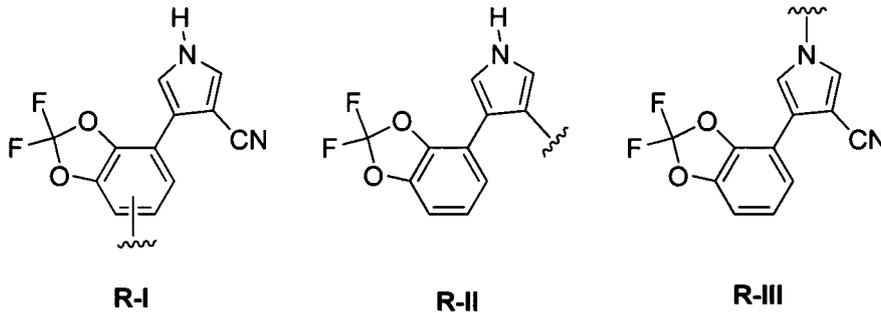
35 20. Un compuesto de fórmula (III):



caracterizado porque

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

40



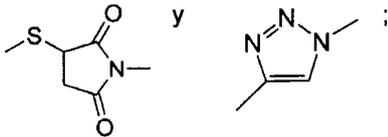
donde

R-I se selecciona del grupo que consiste en

[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],
 [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y
 [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];
R-II es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-ilo];
R-III es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada de 0 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-,

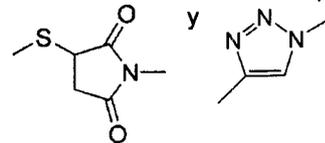


Q es un marcaador no isotopico; y

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 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N.

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-,



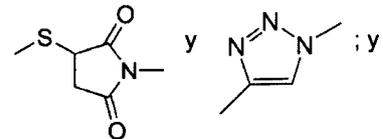
23. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizado porque **Q** se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo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

[4-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo],
 [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo] y
 [7-(4-ciano-1H-pirrol-3-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-ilo];

L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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

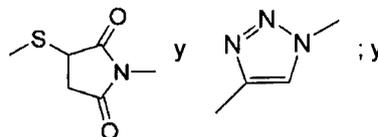


Q se selecciona del grupo que consiste en biotina, fluoresceína o uno cualquiera de sus derivados, un fluoróforo de cianina, un fluoróforo de rodamina, un fluoróforo de cumarina, un bipirilo de rutenio, luciferina o uno cualquiera

de sus derivados, un éster de acridinio, nanopartículas cuánticas, y micro- o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

- 5 25. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado porque T es [4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-3-il]; L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

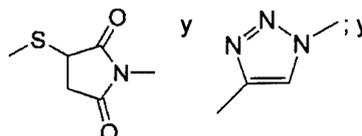
- 10 Z se selecciona del grupo que consiste en -CONH-, -NHCO-, -NH-, -S-,



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

- 20 26. Un compuesto de fórmula (III) según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, caracterizado porque T es [3-ciano-4-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-4-il)-1H-pirrol-1-il]; L es una cadena hidrocarbonada lineal de 0 a 20 átomos de carbono y dicha cadena hidrocarbonada comprende entre 0 y 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O y N;

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



- 30 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, nanopartículas cuánticas, y micro o nanopartículas de oro coloidal, de carbón o de látex.

- 35 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 fludioxonil en una muestra que comprende las siguientes etapas:

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

- 45 29. Método de análisis de fludioxonil según la reivindicación 28, caracterizado porque la determinación de la reacción inmunoquímica en el paso (c) se realiza mediante un inmunoensayo competitivo, usando como competidor un compuesto de fórmula (II) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19.

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

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

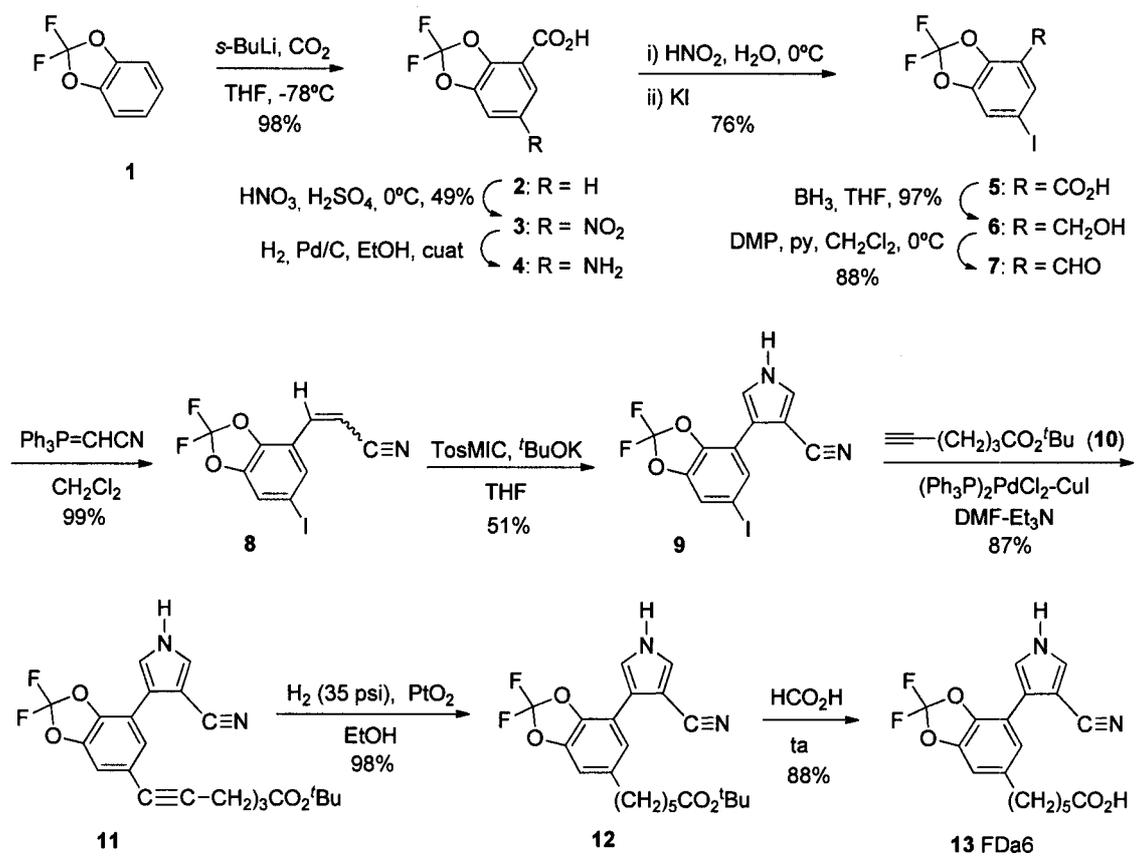


Fig. 1

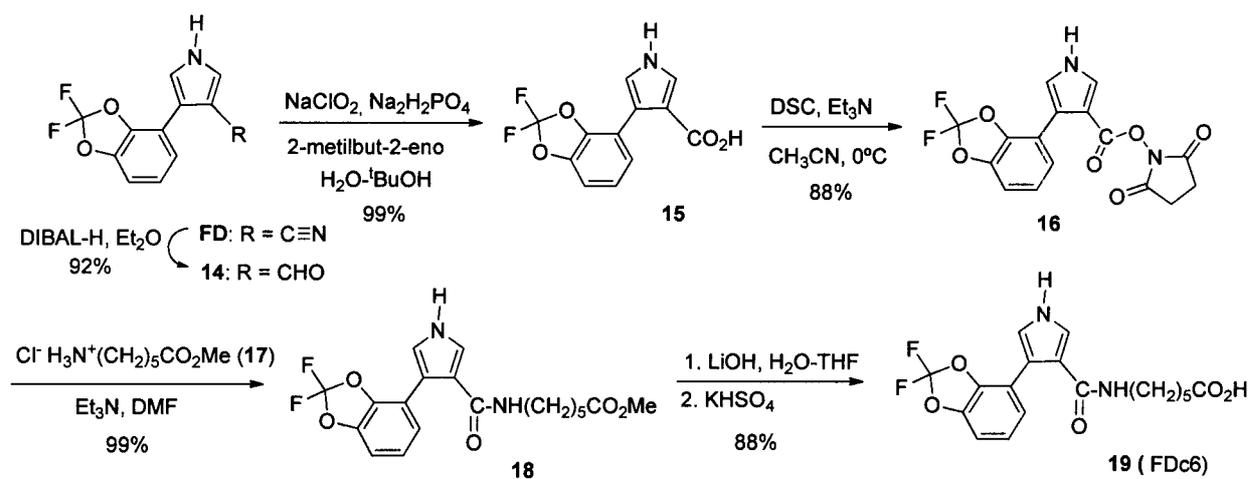


Fig. 2

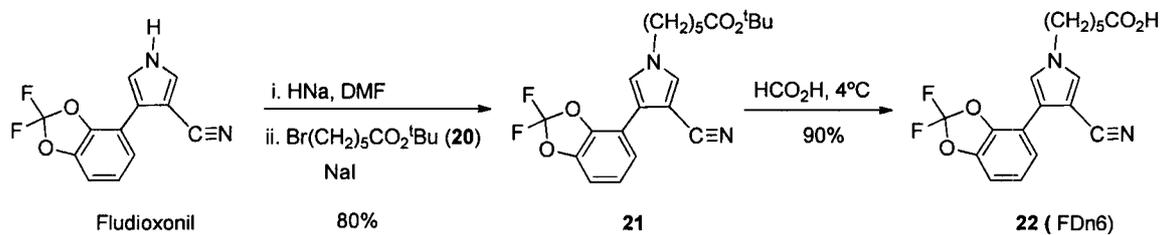


Fig. 3

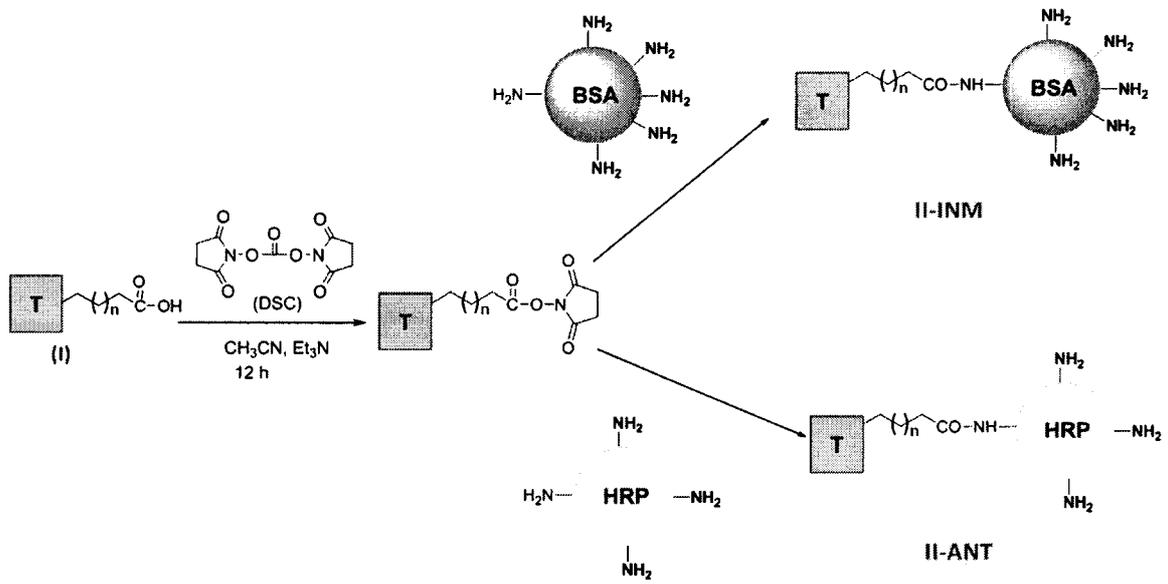


Fig. 4

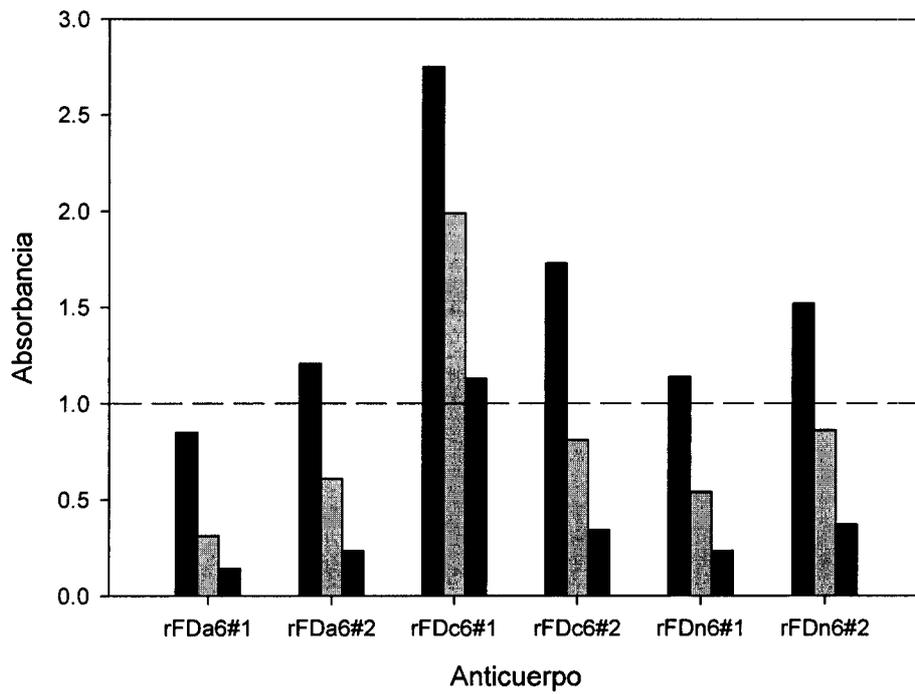


Fig. 5

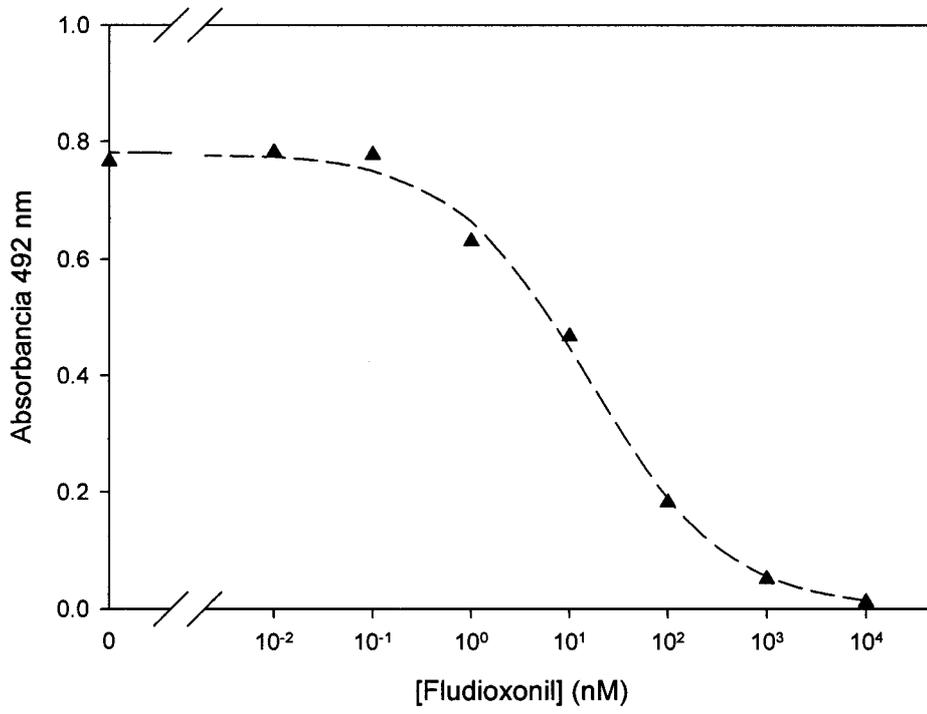


Fig. 6