



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 783**

21 Número de solicitud: 200801474

51 Int. Cl.:

**C07C 317/28** (2006.01) **C07C 315/04** (2006.01)

**C07C 311/38** (2006.01) **G01N 33/52** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **20.05.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2010**

Fecha de la concesión: **14.10.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **27.10.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**27.10.2010**

73 Titular/es: **Universidad de Granada**  
**Cuesta del Hospicio, s/n**  
**18071 Granada, ES**

72 Inventor/es: **Santoyo González, Francisco;**  
**Hernández Mateo, Fernando;**  
**López Jaramillo, Francisco Javier;**  
**Morales Sanfrutos, Julia y**  
**Ortega Muñoz, Mariano**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Compuesto para el etiquetado de biomoléculas basado en vinilsulfona, preparación y usos.**

57 Resumen:

Compuesto para el etiquetado de biomoléculas basado en vinilsulfona, preparación y usos.  
Compuestos que comprenden una molécula etiqueta y un grupo vinilsulfona. Además, se refiere al uso de los compuestos como agentes de etiquetado, al procedimiento de obtención de los mismos y sus usos en el marcaje de biomoléculas, y más concretamente de proteínas.

ES 2 331 783 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

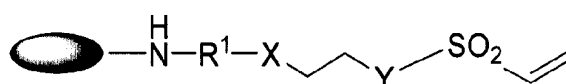
## DESCRIPCIÓN

Compuesto para el etiquetado de biomoléculas basado en vinilsulfona, preparación y usos.

5 La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) que contiene una molécula etiqueta y un grupo vinilsulfona, cuya función es llevar a cabo la unión covalente a las moléculas susceptibles de etiquetado. La presente invención también se refiere a sus procedimientos de obtención y a sus usos. Más particularmente, se refiere al uso de estos compuestos, conteniendo un fluoróforo, para el etiquetado de biomoléculas y a sus aplicaciones biotecnológicas.

10

15



20

(I)

25

**Estado de la técnica anterior**

El etiquetado de biomoléculas es una herramienta básica en el campo de la genómica y la proteómica para la detección, purificación y estudio de interacciones entre biomoléculas.

30

De entre la gama de etiquetados de biomoléculas que son plausibles, destacan por su especial importancia los etiquetados con fluoróforos y con biotina debido a sus aplicaciones biotecnológicas y su impacto comercial.

35

El etiquetado fluorescente es un elemento clave para la detección y análisis de biomoléculas (Patton, W.F. *Electrophoresis* (2000), vol. 21, pp. 1123-1144) y es el motor de una industria de miles de millones de euros. Las ventajas del etiquetado fluorescente, frente a métodos convencionales como son el azul Coomassie, la plata, el oro coloidal o la radioactividad son las siguientes:

40

- Detección rápida y de sensibilidad elevada: cada etiqueta fluorescente puede originar del orden de  $10^7$ - $10^8$  fotones por segundo.

45

- Versatilidad: Distintos etiquetados originan distintos "colores", siendo posible realizar un etiquetado "policromático" como el empleado, por ejemplo, en la secuenciación de ADN (Smith, L., *et al.*, *Nature* (1986), vol. 321, pp. 674-679).

50

- Inercia: Tamaño y propiedades del fluoróforo raramente interfieren con la biomolécula marcada.

55

- Localización de la señal en el punto de etiquetado, a diferencia del etiquetado enzimático.

Sin embargo, su potencial va más allá de la detección pasiva dado que técnicas como la polarización de fluorescencia y FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, también denominado Forster Resonance Energy Transfer) permiten evaluar cambios conformacionales, interacciones entre proteínas o entre proteína y ligando. La medida de la polarización proporciona información sobre orientaciones y movilidad que permite estudiar las interacciones receptor-ligando (Jameson, D.M., Seifried, S.E., *Methods* (1999), vol. 19, pp. 222-233). FRET es una interacción entre fluoróforos en la cual la excitación pasa de un fluoróforo excitado (donante) a otro que se excita (aceptor) sin la emisión de un fotón. Esta interacción se produce cuando la longitud de onda de emisión del donante es muy próxima a la de excitación del aceptor y es muy dependiente de la distancia entre donante y aceptor, por lo que se ha empleado como *regla* (Remedios, C.G., Moens, P.D., *J. Struct. Biol.* (1995), vol. 115, pp. 175-185) para analizar cambios conformacionales e interacción entre biomoléculas.

65

## ES 2 331 783 B1

Actualmente existe una gran cantidad y variedad de fluoróforos. Entre los empleados para el etiquetado de biomoléculas se encuentran el dansilo, la fluoresceína y la rodamina B, cuyas características fundamentales y algunas de sus aplicaciones se resumen en la tabla adjunta:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Fluoróforos	$\lambda$ absorción	$\lambda$ emisión	Algunas aplicaciones
Dansilo	335 nm	518 nm	Etiquetado para detección en general Rendimiento cuántico dependiente del medio: análisis interacción receptor ligando FRET con Triptófano (donante) y con fluoresceína (aceptor) (Gettins, P.G.W., Olson, S.T. <u>Methods</u> (2004), vol. 32, pp. 110-119)
Fluoresceína	494 nm	518 nm	Etiquetado para detección en general Aplicación en polarización de fluorescencia FRET con Rodamina (aceptor) (Ghosh, S.S., et al., <u>Nucleic Acids Res.</u> (1994), vol. 22, pp. 3155-3159) homo-FRET (Hamman, B.D., et al., <u>Biochemistry</u> (1996), vol. 35, pp. 16680-16686)
Rodamina B	543 nm	565 nm	Etiquetado para detección en general Aplicación en polarización de fluorescencia FRET con fluoresceína o dansilo (donadores) (Yegneswaran, S., et al., <u>J. Mol. Biol.</u> (2003), vol. 278, pp. 14614-14621)

55

60

65

Por otro lado, el etiquetado con biotina también tiene gran importancia biotecnológica (Wilchek, M.; Bayer, E. A., *Anal. Biochem.* (1988), vol. 171, pp. 1-32). La biotina es una molécula que actúa como coenzima de determinadas carboxilasas relacionadas con el metabolismo del dióxido de carbono. Sin embargo, su interés biotecnológico radica en la alta especificidad y afinidad que la avidina, estreptavidina y otras proteínas relacionadas presentan por esta biomolécula (constante de disociación del orden de  $10^{-15} \text{ M}^{-1}$ ), haciendo que la interacción tenga la fortaleza de un enlace covalente sin serlo. Así, la biotinización transforma moléculas difícilmente detectables en sondas que pueden ser detectadas o capturadas con avidina/estreptavidina marcadas o inmovilizadas. Este principio es común para localizar antígenos en tejidos, células y para detectar biomoléculas en inmunoensayos y en pruebas de hibridación de ADN. Sin embargo, para determinadas aplicaciones, como por ejemplo la purificación mediante cromatografía de afinidad, se necesita que la interacción biotina-avidina sea reversible, para lo cual se puede modificar tanto la avidina (por nitrosación de las tirosinas del centro activo (Morag, E., et al., *Biochem. J.* (1996), vol. 316, pp. 193-199) como usar derivados de biotina (destiobiotina e iminobiotina). Existen biotinas marcadas fluorescentemente para cuantificar los sitios activos de la avidina (Gruber, H. J., et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1998), vol. 1381, pp. 203-212) y biotina etiquetada con DNP (DNP-X-biocytin-X, US5180828A) (dinitrofenol), etiquetado versátil que además

## ES 2 331 783 B1

de actuar como cromóforo es reconocido por anticuerpos anti-DNP, permitiendo la correlación entre fluorescencia y estudios de microscopía electrónica. Existe también en el mercado peroxidasa de rábano picante (HRP) etiquetada con biotina.

5 Un aspecto fundamental de cara al uso de cualquier etiquetado es la unión a la biomolécula y la estabilidad de dicha unión. Desde un punto de vista químico existen cuatro grupos presentes en las biomoléculas susceptibles de actuar como dianas para el anclaje de los reactivos de etiquetado convenientemente derivatizados a través de la formación de un enlace covalente, como son las aminas, tioles, alcoholes y ácidos carboxílicos, que a continuación se detallan:

10 *Aminas*: Son la diana más común de los reactivos de modificación covalente y la principal en proteínas. En la mayoría de estas biomoléculas el extremo amino está libre y además prácticamente todas tienen lisina, residuo en cuya cadena lateral hay un grupo  $\epsilon$ -amino fácilmente modificable dado que se localiza mayoritariamente en la superficie de las proteínas. Estos grupos reaccionan con reactivos acilantes y la reactividad es dependiente del reactivo acilante, del tipo de amina, basicidad y pH de reacción. Las aminas alifáticas, como la de la cadena lateral de la lisina, son moderadamente básicas y reaccionan con la mayoría de los reactivos acilantes a pH superior a 8.

Tres son las derivatizaciones de los reactivos de etiquetado que reaccionan con las aminas de las biomoléculas:

20 - Succinimidil ésteres. Reaccionan con aminas para originar amidas. Es la derivatización más frecuente dada la estabilidad del enlace amida que se genera. Reaccionan bien con aminas alifáticas y presentan baja reactividad con aminas aromáticas, alcoholes, fenoles (tirosina) e imidazoles (histidina). En presencia de tioles (cisteína) pueden formar tiosteres pero en proteínas el grupo acilo puede ser transferido a una amina vecina. Uno de los principales inconvenientes de los succinimidil ésteres es su solubilidad, que en algunos casos puede ser muy baja. Por ello, en el mercado existen derivados de ácidos carboxílicos que pueden convertirse en sulfosuccinimidil ésteres (Staros, J.V., *et al.*, *Anal. Biochem.* (1986), vol. 156, pp. 220-222) o STP ésteres (Gee, K.R., *et al.*, *Tetrahedron Lett.* (1999), vol. 40, pp. 1471-1474), que son más polares, y por ello más solubles en agua, aunque también menos reactivos con aminas poco expuestas.

30 - Isotiocianatos. Reaccionan con aminas para formar tioureas, las cuales son razonablemente estables en la mayoría de los casos.

35 - Cloruros de ácido sulfónico. Reaccionan con aminas y producen sulfonamidas. Son muy reactivos e inestables en medios acuosos, especialmente al pH alcalino necesario para que reaccionen con las aminas alifáticas, por lo que se trabaja a baja temperatura. Una vez conjugados el enlace es extremadamente estable y resistente. También reaccionan con fenoles (tirosina), alcoholes alifáticos (polisacáridos), tioles (cisteína), e imidazoles (histidina), aunque los conjugados con tioles e imidazoles son inestables y los conjugados con alcoholes alifáticos pueden sufrir desplazamientos nucleofílicos.

40 - Otras funcionalizaciones pueden ser: aldehídos y agentes arilantes. Aldehídos que reaccionan con las aminas para formar bases de Schiff. Se han preparado derivados del *o*-ftalaldehído (OPA), naftalendicarboxaldehído (NDA) y 3-acrilquinilencarboxaldehído (OTTO-TAG) y se han empleado para cuantificación de aminas en solución (Liu, J., Hsieh, *et al.*, *Anal. Chem.* (1991), vol. 163, pp. 408-412). Y agentes arilantes como el cloruro o fluoruro de 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD) (Watanabe, Y., Imai, K., *J. Chromatogr.* (1982), vol. 239, pp. 723-732).

45 *Tioles*. Son dianas más selectivas que el grupo amino, pues son poco frecuentes en biomoléculas y para ser reactivos tienen que estar libres (no formar puente disulfuro). El grupo sulfhídrico puede ser introducido en la macromolécula a marcar vía modificación química, reducción de puentes disulfuro o vía inteína (Tan, L.P., Yao, S.Q., *Protein and Pept. Lett.* (2005), vol. 12, pp. 769-751) (en el caso de proteínas), o mediante mutagénesis dirigida para introducir cisteína.

50 Los grupos tioles reaccionan a pH fisiológico (pH 6.5-8) con reactivos alquilantes (como son las yodoacetamidas y las maleimidias) o arilantes (como el 7-cloro ó 7-fluor-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD)), para originar tioéteres estables. Reaccionan también con muchos de los reactivos acilantes de aminas, incluyendo isotiocianatos y succinimidil ésteres. También los disulfuros simétricos como la didansyl-L-cisteína o el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) (Daly, T.J., *et al.*, *Biochemistry* (1986), vol. 25, pp. 5468-5474) reaccionan con los tioles para dar uniones de tipo disulfuro no simétrico.

60 *Alcoholes*. La función hidroxilo está presente en las cadenas laterales de la tirosina, serina y treonina, en esteroides y carbohidratos, pero su reactividad en soluciones acuosas es extremadamente baja, especialmente en proteínas por la presencia de nucleófilos más activos como las aminas y los tioles. Una función que reacciona específicamente con dioles vecinales es el ácido borónico y forma complejos cíclicos (Gallop, P.M., *et al.*, *Science* (1982), vol. 217, pp. 166-169). Sin embargo, un procedimiento estándar para incrementar la reactividad, especialmente en el caso de carbohidratos, es la oxidación con peryodato para originar la función aldehído. Las principales funcionalizaciones de los reactivos de etiquetado que reaccionan con la función aldehído de las biomoléculas son: amina, hidrazidas, semicarbazida, carbohidrazida y O-alquilhidroxilaminas.

65 *Ácidos carboxílicos*. Son abundantes en macromoléculas pero poco reactivos, por lo que es habitual derivatizarlos de forma tal que se introducen aminas que reaccionan con las funcionalizaciones anteriormente descritas.

Actualmente es posible adquirir comercialmente toda una gama de productos de etiquetado con fluorescencia y con biotina convenientemente derivatizados. La estrategia más frecuente para funcionalizar los reactivos de etiquetado es la derivatización como succinimidil ésteres para reaccionar con las funciones aminas de la biomolécula.

5 Por otro lado, y desde una perspectiva química las sulfonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas (vinil sulfonas) son reconocidas como intermediarios sintéticos de gran utilidad debido fundamentalmente a su capacidad para participar en reacciones de adición 1,4 (aceptores de Michael). Adicionalmente, las vinilsulfonas son fáciles de preparar, a través de una amplia variedad de procesos sintéticos, y de manipular (Simpkins, N. S., *Tetrahedron* (1990), vol. 282, pp. 6951-6984). Estas características han encontrado recientemente utilidad en el diseño de fármacos y en química médica cuando se demostró su capacidad para inhibir de forma potente y reversible una variedad de procesos enzimáticos, fundamentalmente aquellos en los que están implicadas cistein proteasas a las que se unen a través de reacciones de adición con el grupo tiol presente en el residuo de cisteína del sitio activo de estas enzimas (Meadows, D. C., *et al.*, *Med. Res. Rev.* (2006), vol. 26(6), pp. 793-814).

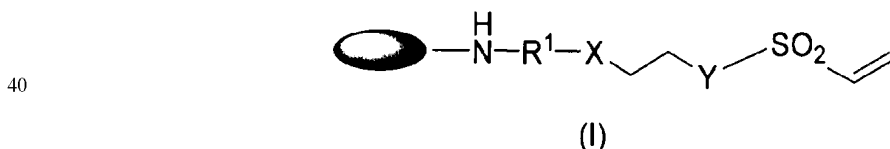
15 Sin embargo, desde un punto de vista biotecnológico su potencial va más allá. La reactividad de las vinilsulfonas con biomoléculas se ha aprovechado para la introducción de polietilenglicol vía reacción con tioles (Morpurgo, M., *et al.*, *Bioconjug. Chem.* (1996) vol. 7, pp. 363-368), para la formación de hidrogeles mediante entrecruzamiento de péptidos con polietilenglicol funcionalizado con vinilsulfona (Rizzi, S. C., *et al.*, *Biomacromolecules* (2006), vol. 7, pp. 3019-3029) y para la introducción de moléculas de glucosa derivatizada con vinilsulfona vía reacción con las aminas de las proteínas (López-Jaramillo, *et al.*, *Acta Cryst.* (2005) vol. F61, pp. 435-438).

20 Como marcadores, se han descrito diferentes compuestos coloreados que contienen grupos vinilsulfona. En este sentido, la patente US4473693 describe colorantes, para el marcaje intracelular, basados en amarillo Lucifer y que contienen un grupo vinilsulfona. En la patente EP0187076 se describen compuestos fluorescentes que contienen un grupo vinilsulfona, estos compuestos son útiles para estudios inmunológicos.

### Explicación de la invención

30 En la presente invención se proporciona un nuevo compuesto de fórmula general (I) que comprende una molécula etiqueta, además de un grupo vinilsulfona, y que permite llevar a cabo el etiquetado de biomoléculas de una forma altamente eficaz y sencilla. Estos compuestos constituyen una alternativa a las derivatizaciones empleadas en proteómica y genómica para introducir un reactivo de etiquetado en biomoléculas.

35 Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) (a partir de ahora compuestos de la invención):



45 donde:

X se selecciona de entre NR, oxígeno (O) ó azufre (S), donde:

50 R es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), hidroxialquilo o el grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ ;

donde n toma valores de entre 2 y 20.


55  $R^1$  es un grupo alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), sustituido o no sustituido; preferiblemente  $R^1$  es un grupo alquilo ( $C_2-C_6$ ); más preferiblemente  $R^1$  es un grupo etilo ( $CH_2-CH_2$ );

Y no existe o es un grupo  $-SO_2R^2$ , donde

60  $R^2$  es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona del grupo que comprende las siguientes fórmulas:  $-CH_2CH_2OR^3OCH_2CH_2$ , ó  $-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2$ ; donde

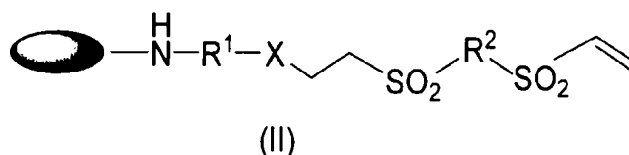
m toma un valor de entre 2 y 20; y

65  $R^3$  es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre los grupos alquilo ( $C_1-C_{10}$ ) ó dialquilarilo ( $((C_1-C_{10})Ar(C_1-C_{10}))$ ); y

 representa una molécula etiqueta.

## ES 2 331 783 B1

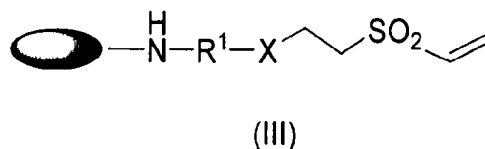
Cuando Y es un grupo  $-\text{SO}_2\text{R}^2$ , los compuestos de la invención tienen la siguiente fórmula general (II):



donde:  $\text{R}^1$ , X y  $\text{R}^2$  están definidos anteriormente.

15 En una realización preferida,  $\text{R}^2$  es un grupo de fórmula  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2$ . En otra realización preferida, m puede tomar un valor de 2 a 10, más preferiblemente m es 2, 3, 4, 5 ó 6; y aún más preferiblemente m puede ser 2 ó 5.

20 Cuando Y no existe, los compuestos de la invención tienen la siguiente fórmula general (III):



donde:  $\text{R}^1$  y X están definidos anteriormente.

35 El término “alquilo” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 2 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes como por ejemplo arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, amino, etc. Si están sustituidos por un hidroxilo se refiere a un “hidroxialquilo”.

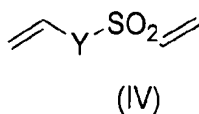
40 Por “dialquilarilo” se entiende en la presente invención a un grupo arilo que está sustituido con dos grupos alquilo que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente tiene de 1 a 5 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser iguales o diferentes, preferiblemente son iguales y por “arilo” se entiende en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 6 a 12 átomos de carbono, puede ser de anillo único ó múltiple, separados y/o condensados. Los grupos arilo típicos contienen de 1 a 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta 18 átomos de carbono de anillo, tales como radicales fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo.

45 El término “molécula etiqueta” se refiere en esta descripción a cualquier sustancia biorreconocible, colorante, fluoróforo o cualquier otro grupo detectable por técnicas espectrofotométricas, fluorimétricas, de microscopía óptica, fluorescencia o confocal, anticuerpos y/o RMN, y que permite fácilmente la detección de otra molécula que por sí sola es difícil de detectar y/o cuantificar.

50 Preferiblemente, esta molécula etiqueta es un fluoróforo seleccionado del grupo de marcadores fluorescentes que son susceptibles de ser derivatizados para la introducción de un grupo hidroxilo, tiol o amina secundaria, con mantenimiento de sus propiedades fluorescentes. Más preferiblemente este fluoróforo es dansilo ó cualquiera de sus derivados.

55 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al método de obtención de los compuestos de la invención, es decir, de los compuestos de fórmula general (I), y que comprende reaccionar:

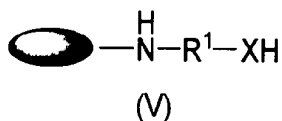
(a) una vinilsulfona funcionalizada de fórmula general (IV), para su unión con las moléculas de etiquetado:



donde Y está definido anteriormente.

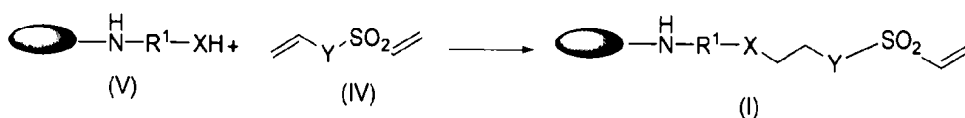
## ES 2 331 783 B1

- (b) con una molécula etiqueta o cualquiera de sus derivados funcionalizados, que contiene un grupo amino secundario, hidroxilo o tior, según la siguiente fórmula general (V):



donde X y R<sup>1</sup> están definidos anteriormente.

Los compuestos (IV) y (V) reaccionan a través de una reacción de adición tipo Michael, según el siguiente esquema:



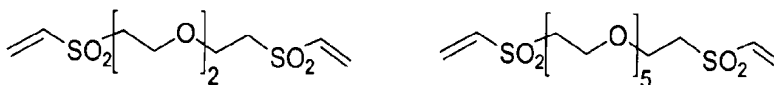
donde: X, Y y R<sup>1</sup> están definidos anteriormente.

En una realización preferida, estos compuestos de fórmula general (IV), cuando Y es -SO<sub>2</sub>R, se obtienen por reacción de divinilsulfona (DVS) con dioles (fórmula general (VI)) en una proporción mayor o igual de 2:1 (≥2:1) para dar bis-vinilsulfonas.



donde m toma valores de entre 2 y 20.

En una realización aún más preferida, estos dioles son etilenglicol (cuando m es 2) y tetraetilenglicol (cuando m es 5), es decir, las bis-vinilsulfonas de fórmula general (IV) son los siguientes compuestos:



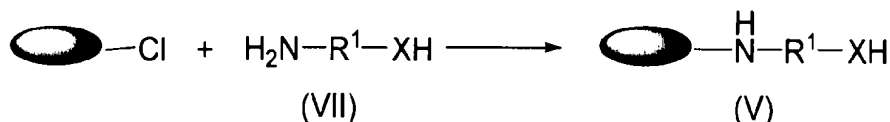
De esta forma, se obtienen compuestos homodifuncionales altamente reactivos pero que permiten modular su reactividad mediante el control de la estequiometría de los reactivos. Así, según el método de la presente invención las vinilsulfonas de fórmula general (IV) permiten llevar a cabo la incorporación, a través de reacciones de adición tipo Michael, de cualquier etiqueta o derivado de las mismas que contenga grupos funcionales con una reactividad complementaria (grupos amino, hidroxilo ó tior) y que dejen inalterado uno de los grupos vinilsulfona para la posterior ligación de los compuestos de la invención resultantes a biomoléculas.

En particular se pueden utilizar, pero sin limitarse a, derivados de moléculas etiqueta conteniendo al menos a) la función amino, b) la función hidroxilo o c) la función tior (compuestos de fórmula general (V)) que en su reacción con las bis-vinilsulfona de fórmula general (IV) conducen a los agentes de etiquetado de la presente invención. En una realización preferida, los compuestos de fórmula general (V) se obtienen por reacciones de moléculas etiquetas o de sus derivados del tipo cloruros de ácido o cloruros de sulfonilo con compuestos aminados de fórmula general (VII) que sean portadores a su vez de las funciones amina secundaria (X = NR), hidroxilo (X = OH) o tior (X = SH) según se indica en el esquema 1.

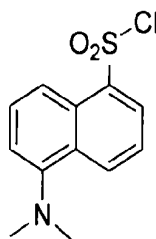
# ES 2 331 783 B1

## Esquema 1

*Síntesis de los derivados funcionalizados de moléculas etiqueta de fórmula (V)*



15 En una realización preferida del método de obtención de los compuestos de la presente invención, el agente de etiquetado utilizado es dansilo. En una realización aún más preferida se utilizan los cloruros derivados de este agente de etiquetado:



30 En una realización preferida de la presente invención, las aminas de fórmula general (VII) usadas son a) 2-(2-aminoetil)-aminoetanol, b) 2-aminoetanol ó c) 2-aminoetanotiol.

35 En una realización preferida de la presente invención, los derivados funcionalizados de las moléculas etiqueta de fórmula general (V) reaccionan con las bis-vinilsulfonas de fórmula general (IV) a través de una reacción de adición tipo Michael usando una estequiometría 1:1. De esta forma se obtiene los compuestos de la invención de fórmula general (I) conteniendo un grupo vinil-sulfona.

40 Los compuestos de la invención proporcionan una técnica de etiquetado que se basa en la ligación quimioselectiva de la función vinilsulfona con grupos presentes de forma natural en las biomoléculas (grupos amino y grupos tioles) y con los que reaccionan a través de reacciones de adición tipo Michael. Además, los compuestos son compatibles con la naturaleza biológica de las biomoléculas y la técnica no requiere ninguna estrategia de activación.

45 El uso de la función vinilsulfona como derivatización de los reactivos de etiquetado para lleva a cabo la unión covalente biomolécula-etiqueta presenta las siguientes ventajas:

- 50
- a) Formación de una unión covalente estable.
  - 45 b) La reacción es rápida y con altos rendimientos no generándose ningún tipo de subproducto.
  - c) No se requieren grandes excesos de reactivos.
  - 50 d) Las reacciones se llevan a cabo en ausencia de catalizadores por simple mezcla de los reactivos.
  - e) Las reacciones pueden llevarse a cabo en agua sin el uso de co- solventes.
  - 55 f) Las reacciones pueden llevarse a cabo bajo condiciones fisiológicas: medio acuoso, rango de pH estrecho, temperaturas suaves.
  - g) Procesos de purificación y aislamiento sencillos.
  - 60 h) Existe una tolerancia hacia los otros grupos funcionales presentes en las biomoléculas distintos de los grupos amino y tioles con los que reaccionan las vinil-sulfonas.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula general (I) como agentes de etiquetado.

65 Los agentes de etiquetado comprenden un grupo vinilsulfona (compuestos de fórmula general (I)) y pueden ser ligados a cualquier biomolécula que contenga grupos funcionales complementarios (grupos amino y/o tiol) presentes en las mismas de forma natural o artificial a través de una reacción de adición tipo Michael (Esquema 2). En una realización preferida de la presente invención, las biomoléculas son proteínas.



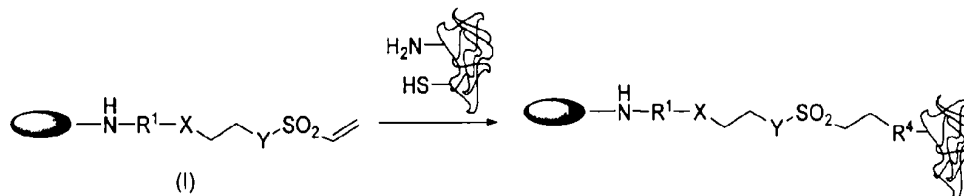
# ES 2 331 783 B1

## Esquema 2

Reacción entre los compuestos de fórmula general (I) y las biomoléculas

5

10



15

donde: R<sup>1</sup>, X e Y están definidos anteriormente y R<sup>4</sup> puede ser NH ó S.

20

En una realización aún mas preferida de la presente invención, las proteínas son seleccionadas del grupo que comprende albúmina sérica bovina (BSA), Concanalina A y lisozima.

25

En una realización preferida de la presente invención el etiquetado de proteínas se realiza en una solución de las mismas en un tampón que no contenga aminas primarias o secundarias como por ejemplo, pero sin limitarse a, fosfato o HEPES, de fuerza fónica moderada (200 mM) y pH básico (7,5) y reacción con un exceso de los reactivos de etiquetado de fórmula general (I) durante un tiempo suficiente (aproximadamente 5 horas a temperatura ambiente) eliminándose el exceso de reactivo mediante diálisis.

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

35

### Descripción de las figuras

40

Fig. 1. Representa la fluorescencia de gel SDS-PAGE de una mezcla de albúmina sérica bovina (66 kDa), conca-navalina A (26 kDa) y lisozima (14 kDa) etiquetadas con el compuesto 14 que revela la posición de las proteínas al ser iluminado con un transiluminador ( $\lambda=365$  nm).

45

### Ejemplos

50

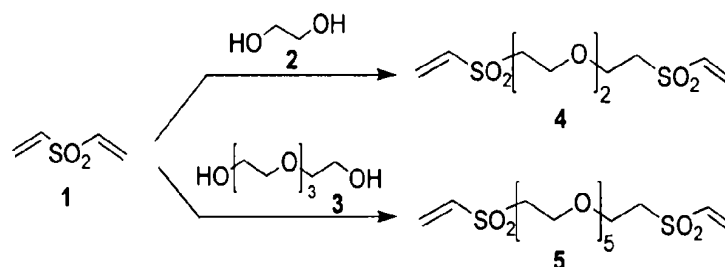
A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de la invención.

55

### Ejemplo 1

Síntesis de bis-vinilsulfonas de fórmula general (IV): compuestos 4 y 5

60



65

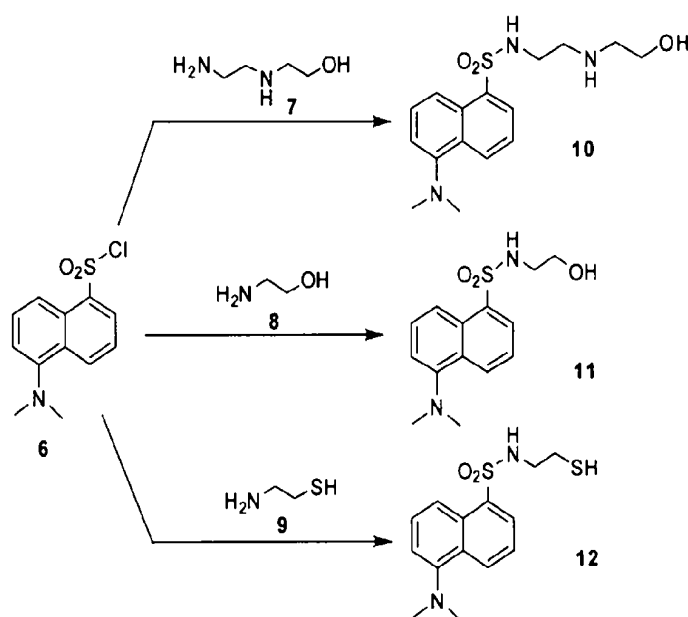
## ES 2 331 783 B1

Compuesto 4: A una disolución de etilenglicol 2 (330 mg, 5.3 mmol) en THF (100 mL) se le adicionaron DVS (1.6 mL, 16 mmol) y t-BuOK (119 mg, 1.1 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (30 min). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 2:1 a 3:1) obteniéndose 4 como un sirope (800 mg, 51%).

Compuesto 5: A una disolución de tetraetilenglicol 3 (1.02 g, 5.26 mmol) en tolueno (20 mL) se le adicionaron DVS (1.5 mL, 15.5 mmol) y DBU (390 mg, 2.5 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 50°C (40 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1) obteniéndose 5 como un líquido (886 mg, 40%).

### Ejemplo 2

*Síntesis de derivados de moléculas de etiquetado funcionalizados con funciones amina secundaria, hidroxilo y tiol, de fórmula general (III). Síntesis de los derivados de dansilo 10-12*



Compuesto 10. A una disolución de cloruro de dansilo 6 (236 mg, 0.87 mmol) en  $Cl_2CH_2$  (5 mL) se le adicionaron 2-(2-aminoetil)-aminoetanol 7 (273 mg, 2.63 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (30 min). Tras dilución con  $Cl_2CH_2$  (100 mL) se lavó con salmuera (2 x 30 mL). La capa orgánica se secó ( $Na_2SO_4$ ) y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido fue el compuesto 10 que puede ser utilizado directamente sin purificación en la siguiente etapa.

Compuesto 11. A una disolución de cloruro de dansilo 6 (270 mg, 1.0 mmol) en  $Cl_2CH_2$  (5 mL) se le adicionó aminoetanol 10 (183 mg, 3 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (60 min). Tras dilución con  $Cl_2CH_2$  (100 mL) se lavó con salmuera (2 x 30 mL). La capa orgánica se secó ( $Na_2SO_4$ ) y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido fue el compuesto 11 que puede ser utilizado directamente sin purificación en la siguiente etapa.

Compuesto 12. A una disolución de cloruro de dansilo 6 (600 mg, 2.22 mmol) en  $Cl_2CH_2$  (15 mL) se le adicionaron 2-aminoetanotiol 9 (505 mg, 4.45 mmol) y  $Et_3N$  (1.1 mL, 7.78 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (30 min). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. Al crudo obtenido se le adicionaron AcOH (30 mL) y Zn (1.8 g). La disolución resultante se reflujo (3.5 h). Tras filtrado sobre celita y dilución con  $Cl_2CH_2$  (100 mL) se lavó con agua, disolución saturada de  $NaHCO_3$  y agua. La capa orgánica se secó ( $Na_2SO_4$ ) y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 1:1 → 2:1) obteniéndose 12 como un sólido (467 mg, 68%).

## ES 2 331 783 B1

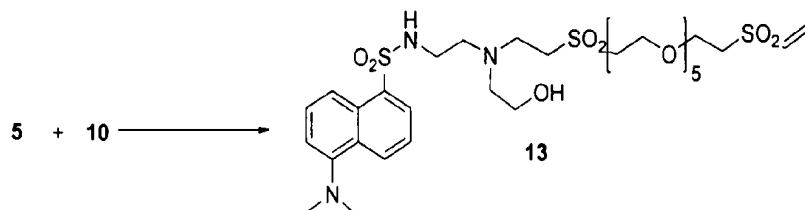
### Ejemplo 3

Síntesis de agentes de etiquetado basados en vinil sulfona de fórmula (I) conteniendo dansilo. Compuestos 13-15

5

10

15



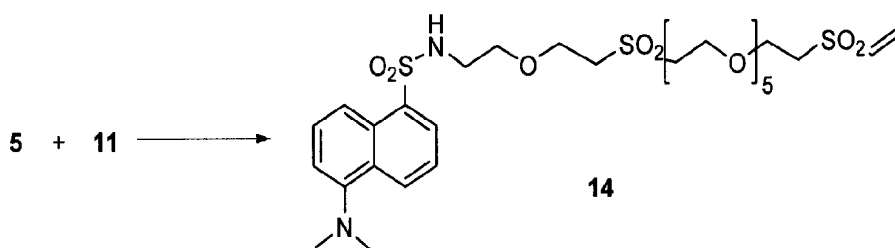
20

Compuesto 13. Una disolución de 10, obtenido según el procedimiento arriba indicado a partir de cloruro de dansilo 6 (236 mg, 0.87 mmol), y el compuesto 5 (490 mg, 1.14 mmol) en *t*-BuOH-acetonitrilo 1:1 (10 mL) se calentó a reflujo (2.5 h). La mezcla de reacción se evaporó a vacío y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 12:1) obteniéndose 13 como un sirope (276 mg, 41% rendimiento total a partir de 6).

25

30

35



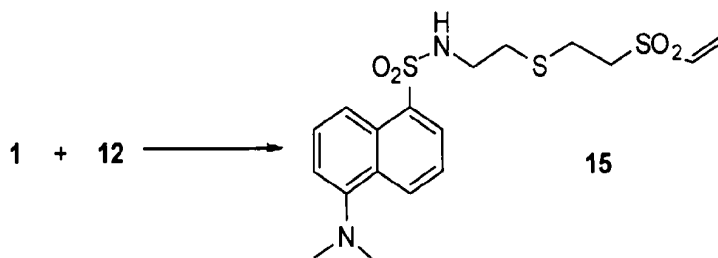
40

Compuesto 14. A Una disolución de 11, obtenido según el procedimiento arriba indicado a partir de cloruro de dansilo 6 (270 mg, 1.0 mmol), y el compuesto 5 (430 mg, 1.0 mmol) en THF(10 mL), se le adicionaron *t*-BuOK (10 mg). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente (2 h). A continuación se evaporó a vacío y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1) obteniéndose 14 como un sirope (305 mg, 47% rendimiento total a partir de 6).

45

50

55



60

Compuesto 15. A una disolución de 12 (50 mg, 0.16 mmol), y el compuesto 1 (29 mg, 0.24 mmol) en THF-isopropanol (1:2, 10 mL), se le pasó una corriente de Ar (5 min) y se le adicionaron Et<sub>3</sub>N (5 μmL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente (16 h). A continuación se evaporó a vacío y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 1:1→éter) obteniéndose 15 como un sirope (45 mg, 65%).

65

## ES 2 331 783 B1

### Ejemplo 4

#### *Etiquetado de proteínas*

##### 5 Ejemplo 4.1

#### *Etiquetado de albúmina sérica bovina (BSA), Concanavalina A y lisozima con el compuesto 14*

10 Se hicieron reaccionar 3.75 nmoles de una solución equimolecular (0.39 mM en agua) de BSA (SIGMA A4503),  
concanavalina A (SIGMA L7647) y lisozima (SIGMA L6876) con 117 nmoles de 14 (58.7 mM en 1:1 metanol-agua)  
durante 5 horas en tampón HEPES 200 mM pH 7.6 y se analizó el resultado en SDS-PAGE (Fig. 1). La fluorescencia  
se visualizó con un transiluminador comercial ( $\lambda=365$  nm). El marcaje fue compatible con la detección mediante  
Coomassie.

##### 15 Ejemplo 4.2

#### *Etiquetado de albúmina sérica bovina (BSA), Concanavalina A y lisozima con el compuesto 15*

20 Se hicieron reaccionar 3.75 nmoles de una solución equimolecular (0.39 mM en agua) de BSA (SIGMA A4503),  
concanavalina A (SIGMA L7647) y lisozima (SIGMA L6876) con 154 nmoles de 15 (58.7 mM en 1:1 metanol-agua)  
durante 5 horas en tampón HEPES 200 mM pH 7.6 y se analizó el resultado en SDS-PAGE (Fig. 2). La fluorescencia  
se visualizó con un transiluminador comercial ( $\lambda=365$  nm). El marcaje fue compatible con la detección mediante  
Coomassie.

25

30

35

40

45

50

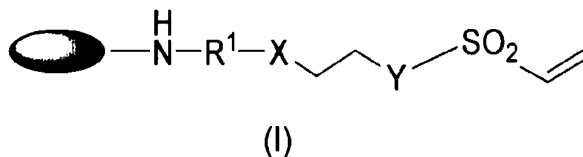
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



15 donde:

X es oxígeno (O), azufre (S), ó el grupo NR, donde

20 R es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), hidroxialquilo o un grupo (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH;

donde n toma valores de entre 2 y 20;


25 R<sup>1</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), sustituido o no sustituido,

Y no existe o es un grupo -SO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, donde

30 R<sup>2</sup> es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre los grupos: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR<sup>3</sup>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, ó -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, donde:

R<sup>3</sup> es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre los grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) ó dialquilarilo ((C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)Ar(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)); y

35 m toma valores de entre 2 y 20; y

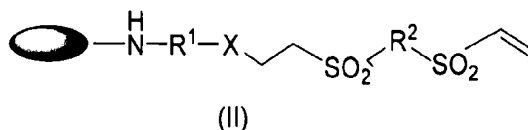
 representa una molécula etiqueta.

40 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde la molécula etiqueta es un fluoróforo.

3. Compuesto según la reivindicación 2, donde el fluoróforo es dansilo.

45 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R<sup>1</sup> es un grupo etilo (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde Y es un grupo -SO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, con la siguiente fórmula general (II):



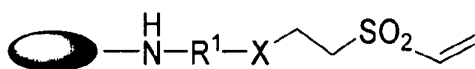
60 donde: R<sup>1</sup>, X y R<sup>2</sup> están definidos en la reivindicación 1.

65 6. Compuesto según la reivindicación 5, donde R<sup>2</sup> es (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, y m está descrito en la reivindicación 1.

7. Compuesto según la reivindicación 6, donde m toma valores de 2 a 6.

ES 2 331 783 B1

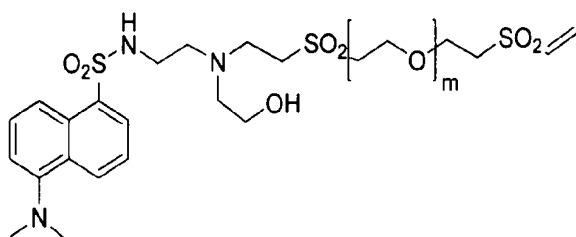
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde Y no existe, con la siguiente fórmula general (III),



(III)

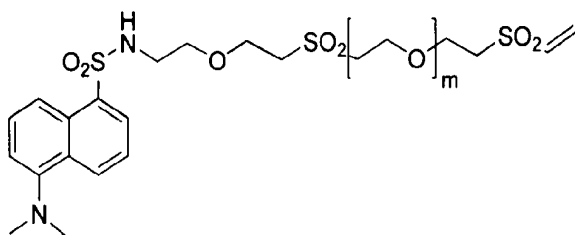
donde: R<sup>1</sup> y X están definidos en la reivindicación 1.

9. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



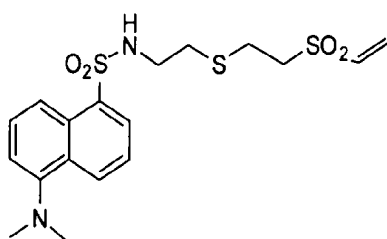
donde m toma valores 2 ó 5.

10. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



donde m toma valores 2 ó 5.

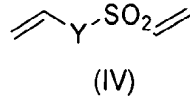
11. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



ES 2 331 783 B1

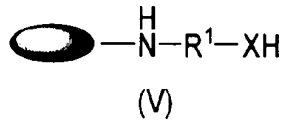
12. Método de obtención del compuesto de fórmula general (I) que comprende la reacción de:

a) una vinilsulfona de fórmula general (IV):



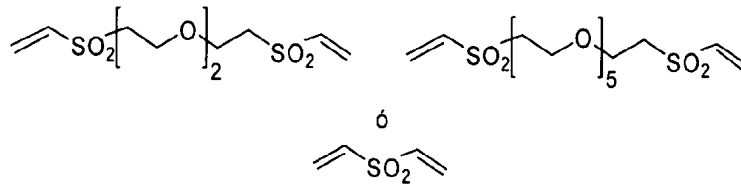
donde Y esta definido en la reivindicación 1

b) con una molécula etiqueta o cualquiera de sus derivados funcionalizados, según la fórmula general (V):

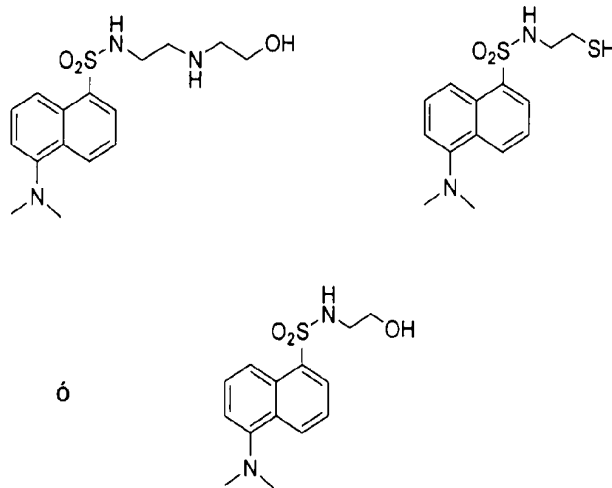


donde: X y R' están definidos en la reivindicación 1.

13. Método según la reivindicación 12, donde la vinilsulfona del paso (a) se selecciona de entre los compuestos de fórmula:



14. Método según la reivindicación 12, donde la molécula etiqueta del paso (b) se selecciona de entre los compuestos de fórmula:



## ES 2 331 783 B1

15. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, como agente de etiquetado.

16. Agente de etiquetado que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

5 17. Uso del agente de etiquetado según la reivindicación 16, para el marcaje de biomoléculas.

18. Uso del agente de etiquetado según la reivindicación 17, donde las biomoléculas son proteínas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

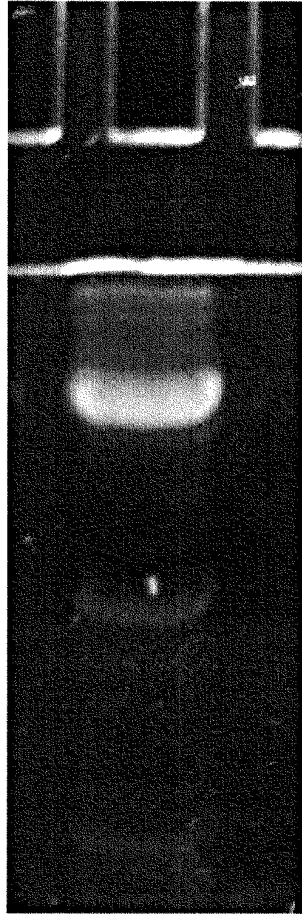
55

60

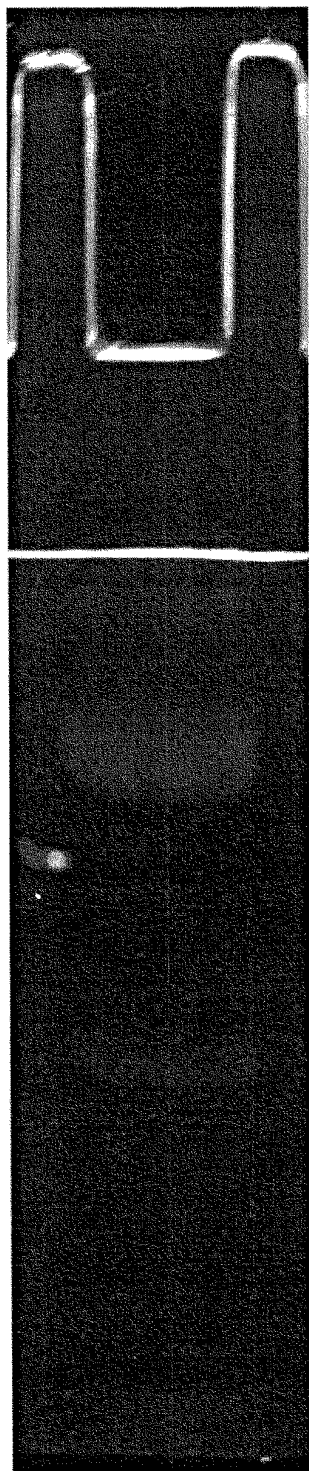
65



ES 2 331 783 B1



**Fig. 1**



**Fig. 2**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 783

② N° de solicitud: 200801474

② Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2008

③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 1887046 A2 (EVERLIGTH USA, INC.) 13.02.2008, párrafos [0005]-[0008]; página 19, ejemplo 42.	1,4,8
X	ES 2269448 T3 (DYSTAR TEXTILFARBEN GMBH & CO. DEUTSCHLAND KG.) 01.04.2007, página 2, línea 5 - página 3, línea 15; página 18, ejemplos 29 y 34.	1,4,8
X	WO 2001070888 A1 (CIBA SPECIALTY CHEMICALS HOLDING INC.) 27.09.2001, página 1, fórmula (1); página 4, fórmula (1a).	1,4,8
X	EP 1207186 A1 (CIBA SPECIALTY CHEMICALS HOLDING INC.) 22.05.2002, página 7, compuestos 1a y 1b.	1,4,8
X	US 20080114166 A1 (DYSTAR TEXTILFARBEN GMBH & CO. DEUTSCHLAND KG.) 15.05.2008, página 9, ejemplo 5.	1,4,8
A	LI, L. et al. "Vinyl Sulfone Bifunctional Derivatives of DOTA Allow Sulfhydryl- or Amino-Directed Coupling to Antibodies. Conjugates Retain Immunoreactivity and Have Similar Biodistributions". Bioconjugate Chemistry 2002, Volumen 13, páginas 110-115. Ver especialmente página 110, resumen; página 112, esquema 1.	1-18

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

**Fecha de realización del informe**

03.12.2009

**Examinador**

G. Esteban García

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07C 317/28** (2006.01)

**C07C 315/04** (2006.01)

**C07C 311/38** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

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

C07C, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP, PUBMED, WOK

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.12.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	2,3,5-7,9-18	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1,4,8	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	2,3,5-7,9-18	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1,4,8	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1887046 A2	13.02.2008
D02	ES 2269448 T3	01.04.2007
D03	WO 2001/070888 A1	27.09.2001
D04	EP 1207186 A1	22.05.2002
D05	US 2008/0114166 A1	15.05.2008

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

El objeto de la invención es un compuesto de fórmula general (I), un método de obtención del mismo por reacción de una vinilsulfona de fórmula general (IV) con una molécula etiqueta de fórmula general (V), el uso del compuesto (I) como agente de etiquetado, un agente de etiquetado que comprende un compuesto de fórmula general (I) y el uso del agente de etiquetado para el marcaje de biomoléculas.

Novedad (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga colorantes reactivos de fórmula general (I) que comprenden un grupo cromóforo (ver párrafos [0005]-[0008]), entre los que se encuentra el compuesto del ejemplo 42 (página 19), que se engloba dentro de la fórmula general (I) de la invención (R1= CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, X=O, Y no existe) y cuyo radical cromóforo contiene un grupo azo.

Por tanto, se considera que el objeto de la invención recogida en las reivindicaciones 1, 4 y 8 no es nuevo con respecto a lo divulgado en el documento D01.

El documento D02 divulga tinturas azoicas reactivas de fórmula general (1) que comprenden un grupo reactivo heterocíclico de fórmula general (2) (ver página 2, línea 5-página 3, línea 15), como, por ejemplo, los grupos 3f (página 5) y 3r (página 7), que presentan una vinilsulfona terminal. En concreto, el documento divulga los compuestos 29 y 34 (página 18), resultantes de la condensación de un cromóforo azoico y una amina que comprende dicha vinilsulfona terminal, y que responden a la fórmula general (I) de la invención cuando R1 es CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, X es O e Y no existe.

Por tanto, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1, 4 y 8 no presenta novedad con respecto a lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga colorantes de fórmula (1) (ver página 1), que comprenden un cromóforo y un radical vinilsulfona terminal reactivo de fórmula (3) (ver página 3). El compuesto preferido es el de fórmula 1a (página 4), que se engloba en la fórmula general (I) de la invención (R1 es CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, X es O e Y no existe).

Del mismo modo, los documentos D04 y D05 divulgan compuestos que comprenden un cromóforo y un grupo vinilsulfona reactivo que responden a la fórmula general (I) de la invención (R1= CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, X=O e Y no existe). Así, en el documento D05 se divulgan los compuestos 1a y 1b (ver página 7), que comprenden cromóforos diazoicos, y en D06 se recoge el compuesto 5 (página 9), que presenta una estructura de trifendioxazina como cromóforo.

En consecuencia, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1, 4 y 8 no es nueva con respecto a lo divulgado en cada uno de los documentos D03-D05.

Sin embargo, ninguno de los documentos D01-D05, tomado solo o en combinación, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones 2 y 3, que se refieren a los compuestos en los que la molécula etiqueta es un fluoróforo, ni tampoco hacia las reivindicaciones 5-7, relativas al compuesto (I) con un grupo sulfona adicional (Y=SO<sub>2</sub>R), así como a las reivindicaciones 9-11, que recogen los compuestos concretos de fórmula (I) derivados de dansilo, y a las reivindicaciones 12-14, relativas al método de obtención del compuesto de la invención, y a las reivindicaciones 15-18, que se refieren al uso del compuesto (1) como agente de etiquetado y a dicho agente de etiquetado.

Hoja adicional

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones 2, 3, 5-7 y 9-18 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.