



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 297**

21 Número de solicitud: 200800592

51 Int. Cl.:

**C07D 249/04** (2006.01)

**C07D 495/04** (2006.01)

**C09B 62/503** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

**G01N 33/533** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **29.02.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2009**

Fecha de la concesión: **20.05.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **04.06.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**04.06.2010**

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;  
Salto González, Rafael y  
Girón González, Dolores**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Agentes de etiquetado doble basados en vinilsulfona.**

57 Resumen:

Agentes de etiquetado doble basados en vinilsulfona.  
Agentes de etiquetado que comprenden un compuesto  
con dos moléculas etiqueta y un grupo vinilsulfona. Ade-  
más, se refiere a los compuestos, el procedimiento de ob-  
tención de los mismos y sus usos en el marcaje de bio-  
moléculas, y más concretamente de proteínas.

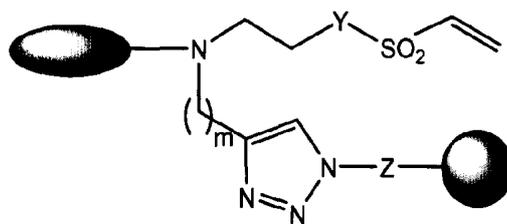
ES 2 325 297 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Agentes de etiquetado doble basados en vinilsulfona.

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) que comprende dos moléculas etiquetas 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 simultáneamente biotina y fluoróforos, para el etiquetado de biomoléculas y a sus aplicaciones biotecnológicas.



(I)

## 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.

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.

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:

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

- 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).

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

- 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 Förster 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.

## ES 2 325 297 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:

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)

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 grupo prostético 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-biotin-X; US5180828A) (dinitrofenol), etiquetado versátil que además 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.

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:

## ES 2 325 297 B1

*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:

- 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 tioésteres 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.

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

- 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.

- 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).

*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.

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-flúor-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.

*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-alkuilhidroxilaminas.

*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.

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 (Simphinks, 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 implicados 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).

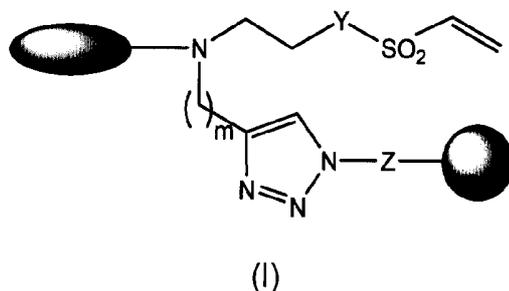
Sin embargo, desde un punto de vista biotecnológico su potencial va más allá. La reactividad de las vinilsulfonas con biomoléculas se ha aprovechado para la introducción de polietilenglicol vía reacción con tioles (Morpurgo, M., *et al.*, *Bioconjug. Chem.* (1996) vol. 7, pp. 363-368), para la formación 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 (Lopez-Jaramillo, *et al.*, *Acta Cryst.* (2005) vol. F61, pp. 435-438).

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.

## 20 Explicación de la invención

En la presente invención se proporciona un nuevo compuesto de fórmula general (I) que comprende dos moléculas etiquetas de distinta naturaleza, 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.

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



donde:

Y es el grupo  $-SO_2R-$  ó no existe; donde

R es un radical, sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), un dialquilarilo ( $(C_1-C_{10})Ar(C_1-C_{10})$ ) ó un grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ ; donde n toma valores de 2 a 20;

Z es un radical, sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), un dialquilarilo ( $(C_1-C_{10})Ar(C_1-C_{10})$ ) o un grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ ; donde n toma valores de 2 a 20, preferiblemente n toma valores de 2 a 10, más preferidamente n es 2, 3, 4 o 5 y aún más preferiblemente n es 2.

En una realización preferida, Z es un grupo alquilo ( $C_1-C_3$ ); y más preferiblemente es un metilo ( $-CH_2-$ ) ó un alquilo ( $-CH_2CH_2-$ ).

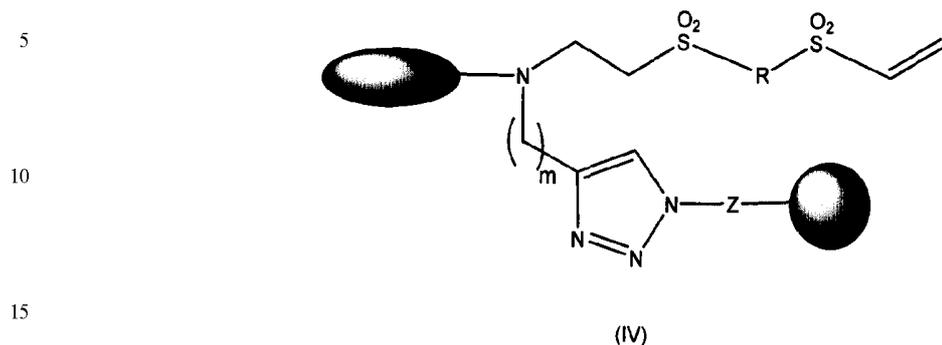
m toma valores de 1 a 20 y representa una cadena alifática (lineal o ramificada, sustituida o no sustituida). Preferiblemente m toma valores de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 y aún más preferiblemente m es 1.



cada figura representa de forma independiente una molécula etiqueta. Cada molécula es de diferente naturaleza.

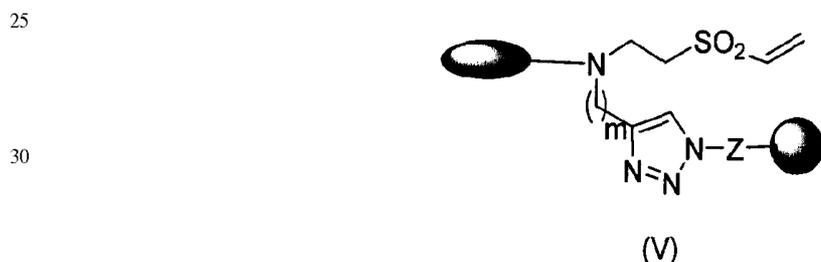
## ES 2 325 297 B1

Cuando Y es un grupo  $-\text{SO}_2\text{R}$ , los compuestos de la fórmula general (IV):



20 En una realización preferida, R es un grupo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ . En otra realización preferida, n puede tomar un valor de entre 2 a 10, más preferiblemente n es 2, 3, 4 ó 5 y aún más preferiblemente n es 2.

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



40 Por “alquilo” se entiende en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbonos, más preferiblemente tienen de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, etc.

45 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 tienen 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 tienen de 6 a 12 átomos de carbono, pueden ser de anillo único ó múltiple, separado y/o condensado. Los grupos arilo típicos contienen de 1 a 3 anillos separados o condensados y desde 6 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono de anillo, tales como radicales fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo.

50 El término “molécula etiqueta” se refiere en esta descripción a cualquier sustancia biorreconocible, colorante, fluoróforo o cualquier otro grupo detectable por técnicas espectrofotométricas, fluorométricas, 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. Preferentemente, esta molécula etiqueta es biotina o un fluoróforo seleccionado de entre marcadores fluorescentes que contienen o son susceptibles de ser derivatizados para la introducción de un grupo ácido carboxílico, un grupo ácido sulfónico ó un grupo azido, a partir de ahora representadas las moléculas etiqueta, con grupos ácido carboxílico ó ácido sulfónico, también según las figuras:



65 Más preferiblemente estos fluoróforos son fluoresceína, dansilo, rodamina o cualquiera de sus derivados. Los derivados de las moléculas etiqueta pueden ser halogenuros de ácido ó de sulfonilo, y más preferiblemente cloruros de ácido o de sulfonilo.

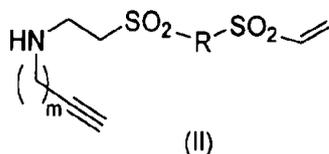
En la presente invención, las dos moléculas etiqueta que incluyen los compuestos de la invención son de diferente naturaleza.

## ES 2 325 297 B1

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de los compuestos de la invención de fórmula general (IV), es decir, cuando Y es el grupo  $-\text{SO}_2\text{R}$ , y que comprende:

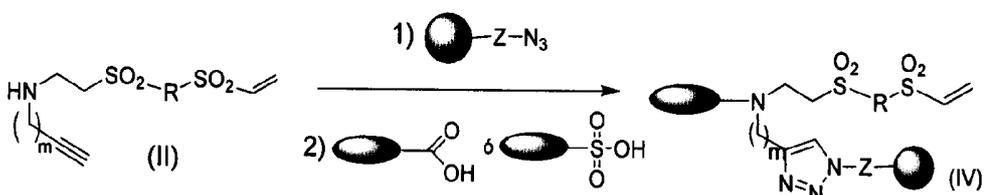
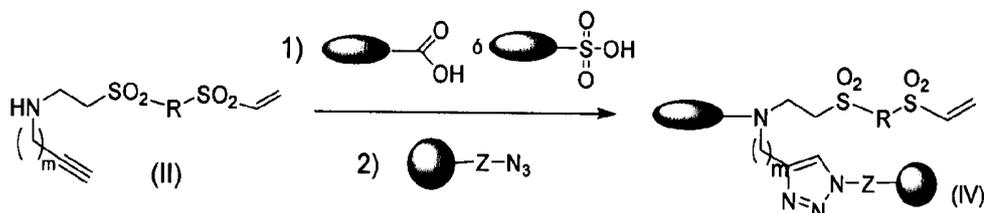
reaccionar:

- una vinilsulfona funcionalizada de fórmula general (II), conteniendo al menos un grupo amino y un grupo alquilo terminal, para la unión con las moléculas etiqueta,



donde R y m están definidos anteriormente.

- con una molécula etiqueta que contiene un grupo ácido carboxílico, un grupo ácido sulfónico o cualquiera de los derivados activados de estas funciones antes o después de reaccionar con un azido derivado de otra molécula de etiquetado de diferente naturaleza a la anterior, según cualquiera de los siguientes esquemas:



donde: Z, m y R están definidos anteriormente.

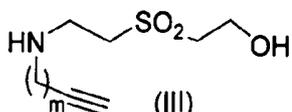
El orden secuencial de estas reacciones es indistinto, primero puede reaccionar el ácido derivado de una molécula etiqueta o cualquiera de sus derivados activados con el compuesto de fórmula general (II) para formar una unión de tipo amida o sulfonámica y posteriormente el azido derivado de otra molécula etiqueta; o primero puede reaccionar el azido derivado de una molécula etiqueta con el compuesto de fórmula general (II) y posteriormente el ácido de otra molécula etiqueta o cualquiera de los derivados activados de esta función, obteniéndose de la misma forma, y en los dos casos, el compuesto de fórmula general (IV) que corresponde al compuesto de fórmula general (I) de la invención cuando Y es el grupo  $-\text{SO}_2\text{R}$ .

En una realización preferida de la presente invención, se puede utilizar el cloruro de ácido derivado o el cloruro de sulfonilo derivado de las moléculas etiquetas.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de los compuestos de la invención de fórmula general (V), es decir, cuando Y no existe, y que comprende:

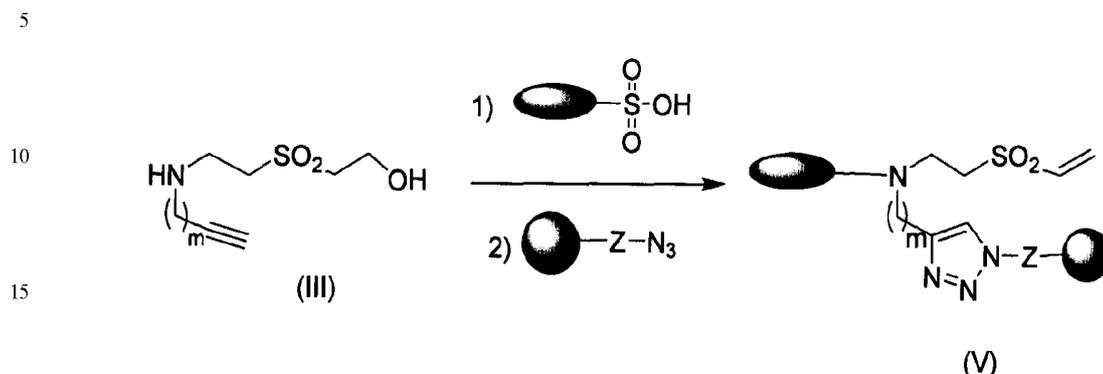
reaccionar:

- un compuesto derivado de 2- $\{[\omega\text{-alquilalquilamino}]\text{ethyl}\}$ sulfonyl]etanol de fórmula (III), conteniendo al menos un grupo amino secundario y un grupo alquilo terminal para la unión con moléculas de etiquetado,



donde m está definido anteriormente.

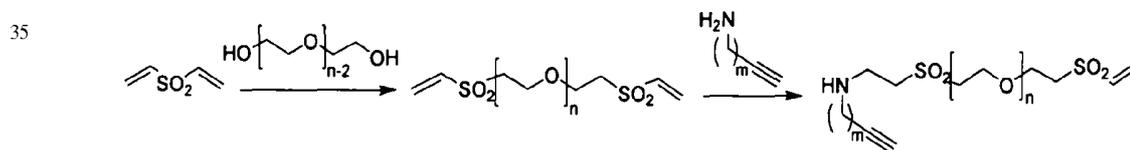
- con una molécula etiqueta que contiene un grupo ácido sulfónico, más preferiblemente una molécula etiqueta derivada con un grupo cloruro de sulfonilo, y posterior reacción con un azido derivado de otra molécula de etiquetado diferente de la anterior:



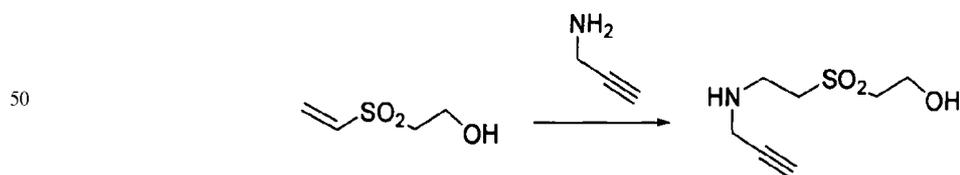
20 Donde: Z y m están definidos anteriormente.

El orden secuencial de las reacciones es el indicado anteriormente, obteniéndose mediante este procedimiento compuestos de fórmula general (V) que corresponden a los compuestos de fórmula general (I) de la invención cuando Y no existe.

25 Una realización preferida de la presente invención comprende vinilsulfonas funcionalizadas de fórmula general (II) donde R es el grupo  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ , n está descrito anteriormente; n puede tomar un valor de entre 2 a 10, más preferiblemente n es 2, 3, 4 ó 5 y aún más preferiblemente n es 2. Estas vinilsulfonas funcionalizadas se pueden obtener por reacción de divinilsulfona (DVS) con etilenglicol (cuando n es 2) ó derivados de polietilenglicol (cuando n es mayor de 2) y posterior reacción de uno de los grupos vinil sulfona con  $\omega$ -alquilalquilamino a través de una reacción de adición tipo Michael, como se muestra a continuación:



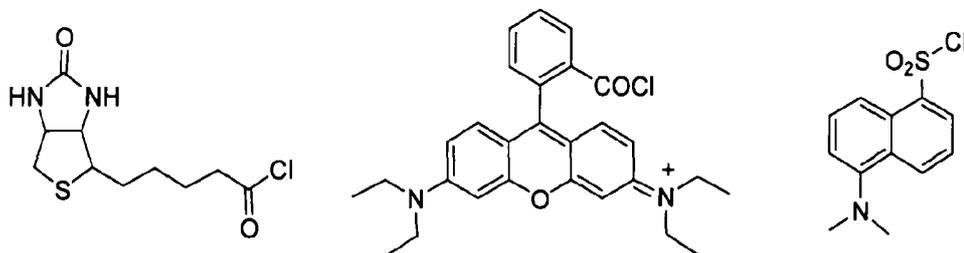
45 En otra realización preferida de la presente invención el compuesto de fórmula (III) es 2-[[2-(prop-2-in-1-ilamino)etil]sulfonil]etanol que se puede obtener por reacción de (2-etenilsulfonil)etanol y propargilamina, según el siguiente esquema:



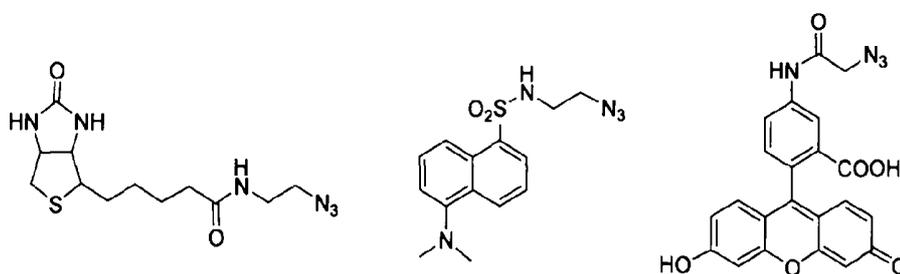
De esta forma, los compuestos de fórmulas (II) y (III) son compuestos trifuncionales con grupos que presentan una reactividad ortogonal entre sí, circunstancia que permite modular su reactividad. Así, según cualquiera de los métodos de la presente invención, las vinilsulfonas de fórmula general (II) y (III) permiten llevar a cabo la incorporación de cualquier molécula etiqueta que contenga grupos funcionales con una reactividad complementaria a los grupos presentes en las mismas y que dejen inalterado un grupo vinilsulfona el cual es usado para la posterior ligación a las biomoléculas. En particular y dado que las vinilsulfonas de fórmulas (II) de la realización preferida de la presente invención son portadoras de las funciones amino y alquínilo se pueden utilizar, pero sin limitarse a, derivados de moléculas etiqueta conteniendo: a) la función cloruro de ácido ó cloruro de sulfonilo y b) la función azido, respectivamente. De forma alternativa dado que las vinilsulfonas de fórmulas (III) de la realización preferida de la presente invención son portadoras de las funciones amino, hidroxilo y alquínilo se pueden utilizar, pero sin limitarse a, derivados de moléculas etiqueta conteniendo: a) la función cloruro de sulfonilo y b) la función azido.

## ES 2 325 297 B1

En una realización preferida de la presente invención las moléculas etiqueta utilizadas son biotina y los fluoróforos seleccionados de entre fluoresceína, dansilo o rodamina, o cualquiera de sus derivados. Una realización aún más preferida de la presente invención comprende los siguientes cloruros de ácido y el cloruro sulfonilo de estas moléculas etiqueta:



y también los azido derivados, que se indican a continuación:



En una realización preferida de la presente invención, la obtención de los compuestos de la invención, agentes de etiquetado doble, se lleva a cabo por reacción de los anteriores derivados de moléculas etiqueta (cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo y azido derivados) con vinilsulfonas de fórmula general (II) ó con 2-[[ $\omega$ -alquilalquilamino]ethyl]sulfonyl]etanol de fórmula (III) a través de: a) reacciones de N-acilación con cloruros de ácido de las etiquetas; o reacciones de N-sulfonación con cloruros de sulfonilo y b) reacciones de cicloadición 1,3-dipolares con azido derivados de las moléculas etiqueta. El orden secuencial de estas reacciones es indistinto para el caso del primer método de la invención descrito, aunque en una realización preferida el orden es N-acilación/cicloadición. Para el caso del segundo método de la invención, anteriormente descrito, el orden secuencial de estas reacciones es N-sulfonación seguido de cicloadición.

El uso de la función vinilsulfona como derivatización de los reactivos de etiquetado para llevar a cabo la unión covalente biomolécula-compuesto de la invención, presenta las siguientes ventajas:

- Estabilidad de los agentes de etiquetado.
- Formación de una unión covalente estable.
- La reacción es rápida y con altos rendimientos no generándose ningún tipo de subproducto.
- No se requieren grandes excesos de reactivos.
- Las reacciones se llevan a cabo en ausencia de catalizadores por simple mezcla de los reactivos.
- Las reacciones pueden llevarse a cabo en agua sin el uso de co-solventes.
- Las reacciones pueden llevarse a cabo bajo condiciones fisiológicas: medio acuoso, rango de pH estrecho, temperaturas suaves.
- Procesos de purificación y aislamiento sencillos.
- 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.

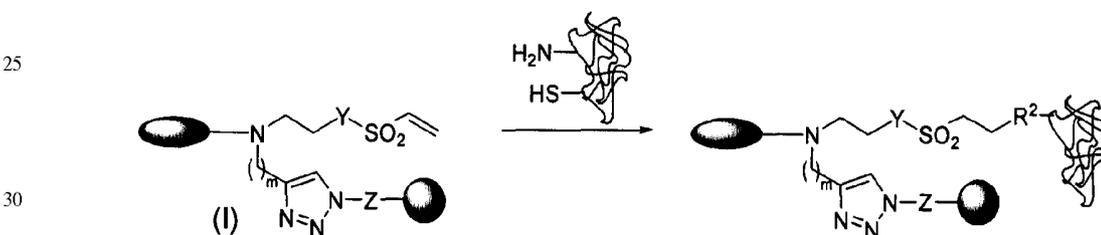
Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula general (I) como agentes de etiquetado para el marcaje o etiquetado de moléculas, y más preferiblemente de biomoléculas. En la presente invención se entiende por "agente de etiquetado" aquellos compuestos capaces de unirse a una molécula y

que además permitan la visualización, detección y/o cuantificación mediante espectroscopia (absorción, fluorescencia, RMN y otros), reacción enzimática (peroxidasa, fosfatasa alcalina y otros) o espectrometría (masas y otros) de la molécula objeto del marcaje.

5 Los agentes de etiquetado doble conteniendo vinilsulfonas (compuestos de fórmula general (I)) pueden ser ligados a cualquier biomolécula que contenga grupos funcionales complementarios (grupos amino y grupos tioles) presentes en las mismas de forma natural o artificial a través de una reacción de adición tipo Michael. Además, los compuestos son compatibles con la naturaleza biológica de las biomoléculas y la reacción de marcaje no requiere ninguna estrategia de activación.

10 En una realización preferida de la presente invención, las biomoléculas seleccionadas son proteínas. En una realización aún más preferida de la presente invención, las proteínas seleccionadas son albúmina sérica bovina (BSA), albumina sérica humana (HSA), lisozima, peroxidasa de rábano picante, peroxidasa de alcachofa, GFP (Green fluorescent protein) o Concanavalina A.

15 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 aminos libres como por ejemplo, pero sin limitarse a, fosfato o HEPES, de fuerza iónica moderada (50-200 mM) y pH básico (7,5-8,7) y reacción con un exceso de los reactivo de etiquetado de fórmula general (I) durante un tiempo suficiente (habitualmente durante unas horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C) eliminándose el exceso de reactivo mediante diálisis. El etiquetado se lleva a cabo mediante el siguiente esquema:



Donde:

35 Y, Z y m están definidos anteriormente;

R<sup>2</sup> puede ser NH ó S; y

40  representa una biomolécula.

45 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.

50 **Descripción de las figuras**

Fig 1: Muestra la fluorescencia de gel SDS-PAGE de BSA tras reacción con el agente de etiquetado doble 25 en función de las condiciones de reacción. Calles 2, 3, 4 y 5 marcaje a temperatura ambiente y estequiometrías reactivo de marcaje:proteína 5:1, 10:1, 25:1, y 50:1, respectivamente. Calles 6, 7, 8 y 9 marcaje a 37°C y estequiometrías 5:1, 10:1, 25:1, y 50:1, respectivamente. Calle 10 BSA control (sin marcar).

Fig 2: Muestra el espectro de emisión del agente de etiquetado doble 29 (A), de la HSA control (B) y de la HSA marcada (C) tras excitación a 280 nm.

60 Fig 3: Muestra la fluorescencia de gel SDS-PAGE tras reacción con el agente de etiquetado doble 25 con la HRP (Fig. 3A) y con la peroxidasa de alcachofa (Fig. 3B). De izquierda a derecha, las estequiometrías reactivo marcaje:peroxidasa son 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50.

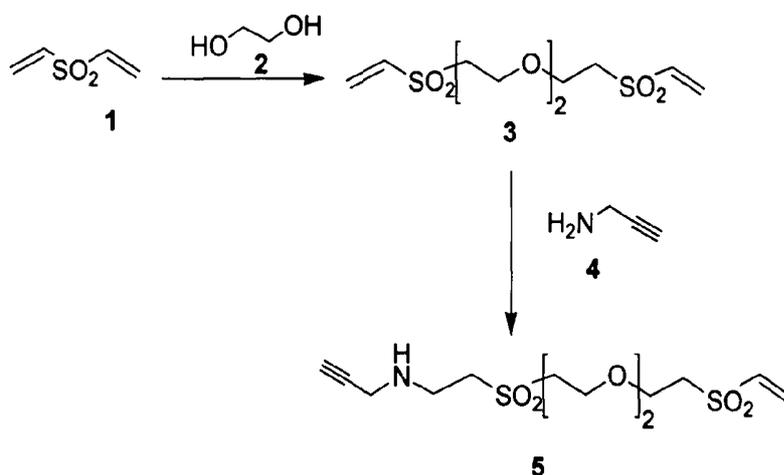
65 Fig 4: Muestra la fluorescencia de gel SDS-PAGE tras reacción de HRP con el agente de etiquetado doble 25 (calles de la izquierda) y 27 (calles de la derecha).

## Ejemplos

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

## Ejemplo 1

Síntesis de vinilsulfonas conteniendo grupos propargilo y aminas secundarias. Compuestos de fórmula general (II).

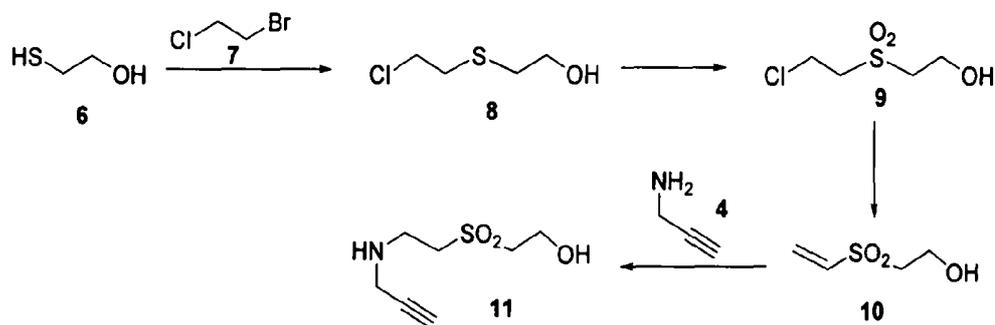


Compuesto 3: A una disolución de etilenglicol 2 (330 mg, 5.3 mmol) en THF (100 mL) se le adicionaron DVS 1 (1.6 mL, 16 mmol) y t-BuOK (119 mg, 1.1 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (30 min). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por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

Compuesto 5: A una disolución de 3 (414 mg, 1.4 mmol) en Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-isopropanol 2:1 se le adicionó propargilamina 4 (51 mg, 0.93 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (1 día). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna (AcOEt a AcOEt-MeOH 10:1) obteniéndose 5 como un sirope (170 mg, 52%).

## Ejemplo 2

Síntesis de derivados de 2-[[2-alquilamino)ethyl]sulfonyl]etanol de fórmula general (III).



Compuesto 8: Una disolución de mercaptoetanol 6 (300 mg, 3.84 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 mL) se desoxigenó por burbujeo de Ar durante 5 min. Se adicionó bromocloroetano 7 (0.7 mL, 7.68 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.9 g, 5.76 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación durante 16 h. Tras filtración del Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, el disolvente se eliminó por evaporación a vacío y el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 2:1) obteniéndose 8 (410 mg, 76%).

Compuesto 9: A una disolución de 8 (237 mg, 1.68 mmol) en AcOH (8.5 mL) se le adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 33% (3.4 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 día. Tras evaporación a vacío el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (éter) obteniéndose 9 (182 mg, 63%).

## ES 2 325 297 B1

Compuesto 10: A una disolución de 9 (0.846 g, 4.9 mmol) en THF (10 mL) se le adicionó Et<sub>3</sub>N (2 mL, 14 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente (1.5 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío y el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt) obteniéndose 10 (540 mg, 81%).

5 Compuesto 11: A una disolución de 10 (577 mg, 4.24 mmol) en THF-isopropanol 1:2 (20 mL) se le adicionó propargilamina 4 (212 mg, 3.85 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (1 día). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) obteniéndose 11 como un sólido (710 mg, 96%).

10

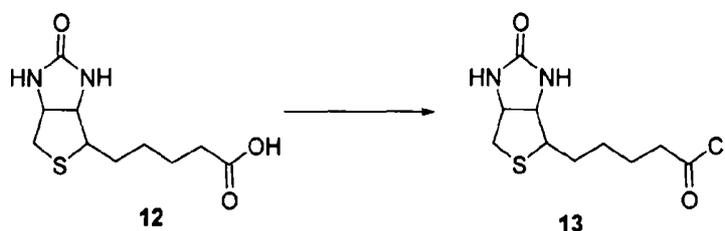
### Ejemplo 3

#### Síntesis de derivados de cloruros de ácido

15 Ejemplo 3.1

#### Síntesis del cloruro de ácido derivado de biotina

20



30

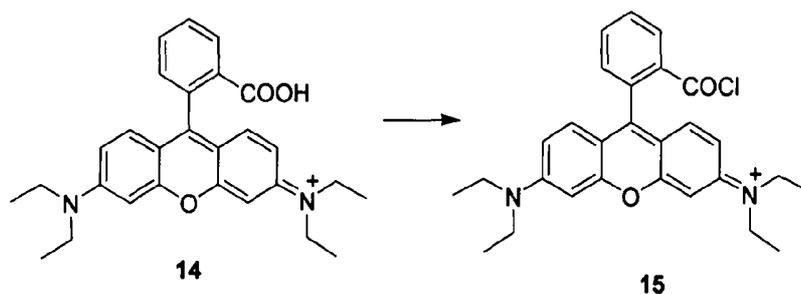
Compuesto 13: Una disolución de biotina 12 (200 mg, 0.82 mmol) en Cl<sub>2</sub>SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente (1 h). El exceso de Cl<sub>2</sub>SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El sirope obtenido corresponde al compuesto 13 y se usa directamente sin ningún tipo de purificación.

35

### Ejemplo 3.2

#### Síntesis del cloruro de ácido derivado de rodamina B

40



50

55 Compuesto 15: Una disolución de rodamina B 14 (195 mg, 0.41 mmol) en POCl<sub>3</sub> (5 mL) y 1,2-dicloroetano (5 mL) se mantuvo a reflujo (16 h). El exceso de POCl<sub>3</sub> y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El crudo obtenido contiene el cloruro de rodamina 15 y es usado directamente sin ningún tipo de purificación.

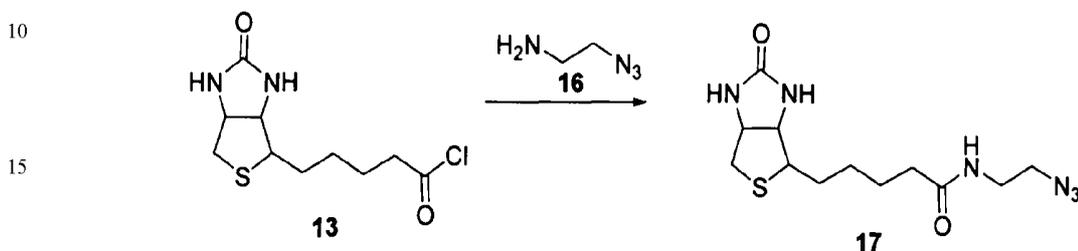
60

65

## Ejemplo 4

*Síntesis de azido derivados*

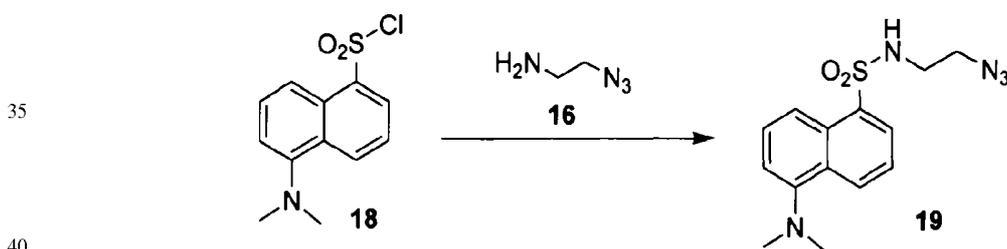
## Ejemplo 4.1

*Síntesis del azido derivado de biotina 17*

20 Compuesto 17: A una disolución en acetonitrilo anhidro (15 mL) del cloruro derivado de biotina 13 obtenido según se indica en el ejemplo 3.1 a partir de biotina (0.3 g, 1.22 mmol) se le adicionaron 2-azido etilamina 16 (0.22 g, 2.45 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.525 mL) disueltos en acetonitrilo anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (15 min). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío y el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) obteniéndose 17 (0.28 g, 73%).

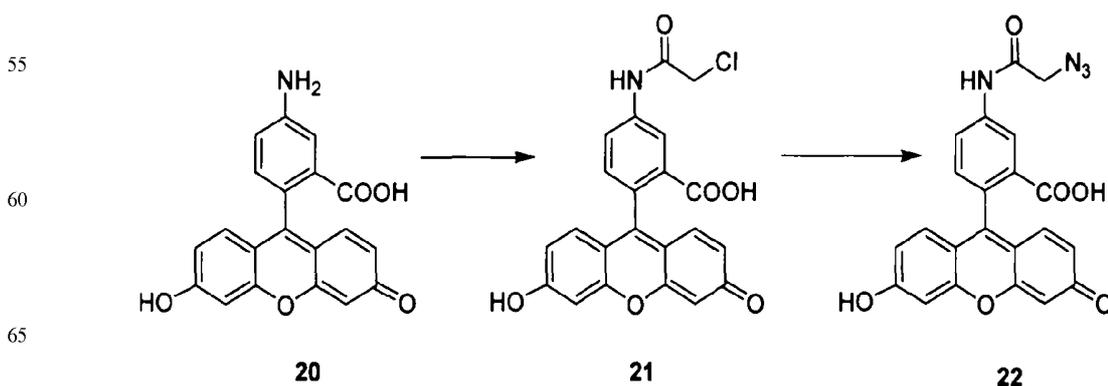
25

## Ejemplo 4.2

*Síntesis del azido derivado de dansilo 19*

45 Compuesto 19: A una disolución de cloruro de dansilo comercial 18 (600 mg, 2.2 mmol) en Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (15 mL) se le adicionaron 2-azido etilamina 16 (390 mg, 4.5 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.5 mL, 3.5 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (15 min). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 2:1) obteniéndose 19 como una espuma sólida (680 mg, 96%).

## Ejemplo 4.3

*Síntesis del azido derivado de fluoresceína 22*

## ES 2 325 297 B1

Compuesto 21: A una disolución de fluoresceínaamina 20 (450 mg, 1.3 mmol) en MeOH se le adicionó anhídrido cloroacético (443 mg, 2.6 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (1 día). El precipitado que fue apareciendo se filtró, lavó (con MeOH y posteriormente éter) y secó obteniéndose así 21 (440 mg, 80%).

5 Compuesto 22: A una suspensión de 21 (400 mg, 0.94 mmol) en MeOH (20 mL) se le adicionó azida sódica (306 mg, 4.7 mmol). La mezcla de reacción se irradió con MW (500 W, 65°C, 10 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt, AcOEt-MeOH 1:1 a MeOH) obteniéndose 22 como un sólido (330 mg, 82%).

10

### Ejemplo 5

#### Síntesis de agentes de etiquetado doble basados en vinil sulfonas conteniendo biotina y fluoróforos

15 Ejemplo 5.1

#### Síntesis de los agentes de etiquetado 24 y 25

20

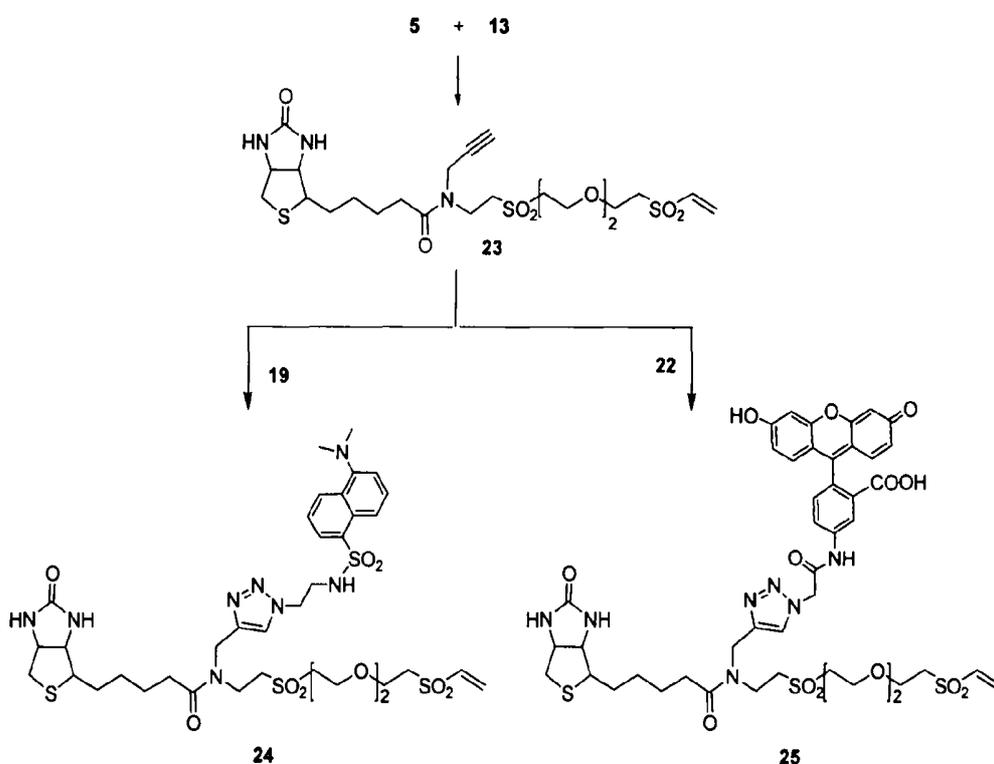
25

30

35

40

45



50 Compuesto 23: Una disolución de cloruro de biotina 13 en THF anhidro (15 mL), obtenido a partir de biotina (200 mg, 0.82 mmol) según se indica en el ejemplo 3.1, se enfrió en un baño de agua-hielo y se le adicionaron 5 (353 mg, 1 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.230 mL, 1.6 mmol) disueltos en THE anhidro (5 mL). Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente procediéndose entonces a la eliminación del disolvente por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) obteniéndose 23 como un sirope (438 mg, 92%).

55

Compuesto 24: A una disolución de 23 (120 mg, 0.21 mmol) en MeOH (15 mL) se le adicionaron 19 (80 mg, 0.25 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.09 mL, 0.62 mmol) y CuI(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>3</sub>P (8 mg, 0.022 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (3.5 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 3:1) obteniéndose 24 como un sólido (167 mg, 90%).

60

Compuesto 25: A una disolución de 23 (115 mg, 0.2 mmol) en MeOH (15 mL) se le adicionaron 22 (102 mg, 0.24 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.085 mL, 0.4 mmol) y CuI(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>3</sub>P (10 mg, 0.023 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (3.5 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 3:1 a MeOH) obteniéndose 25 como un sólido (140 mg, 70%).

65

## Ejemplo 5.2

## Síntesis del agente de etiquetado 27

5

10

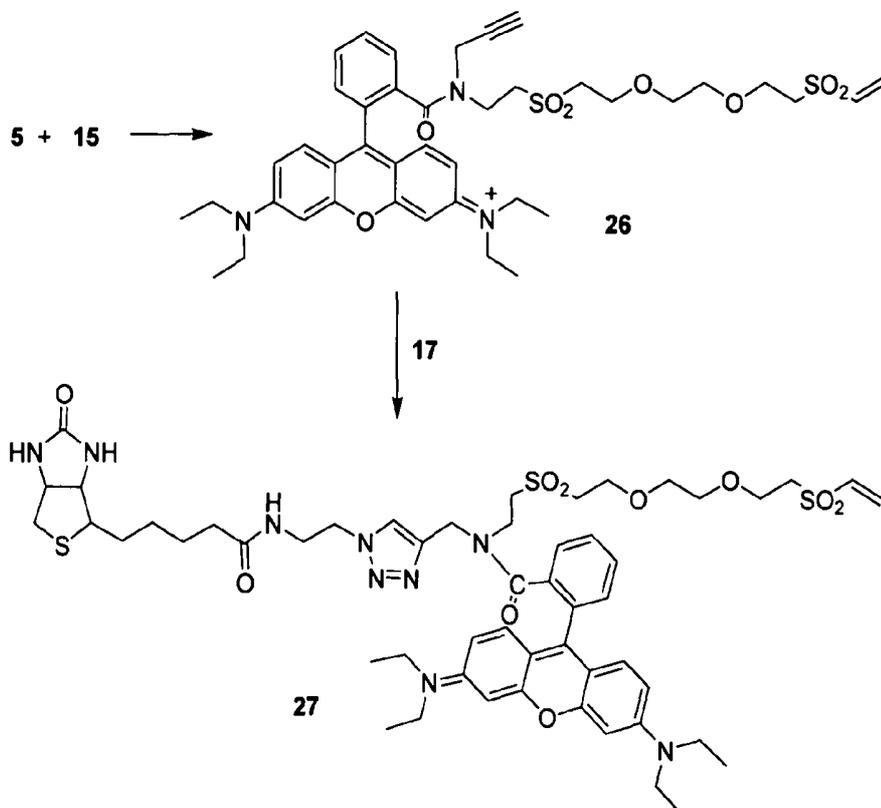
15

20

25

30

35



Compuesto 26: Una disolución del cloruro de rodamina B 15 en THF anhidro (15 mL), obtenido a partir de rodamina B (195 mg, 0.41 mmol) según se indica en el ejemplo 3.2, se enfrió en un baño de agua-hielo y se le adicionaron 5 (174 mg, 0.49 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.174 mL, 1.22 mmol) disueltos en THE anhidro (5 mL). Se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente procediéndose entonces a la eliminación del disolvente por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (Cl<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-MeOH 20:1) obteniéndose 26 como un sólido (272 mg, 86%).

Compuesto 27: A una disolución de 26 (140 mg, 0.18 mmol) en MeOH (15 mL) se le adicionaron el azido derivado 17 (69 mg, 0.22 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.080 mL, 0.057 mmol) y CuI(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>3</sub>P (10 mg, 0.029 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (3.5 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 3:1 a MeOH) obteniéndose 27 como un sólido (141 mg, 72%).

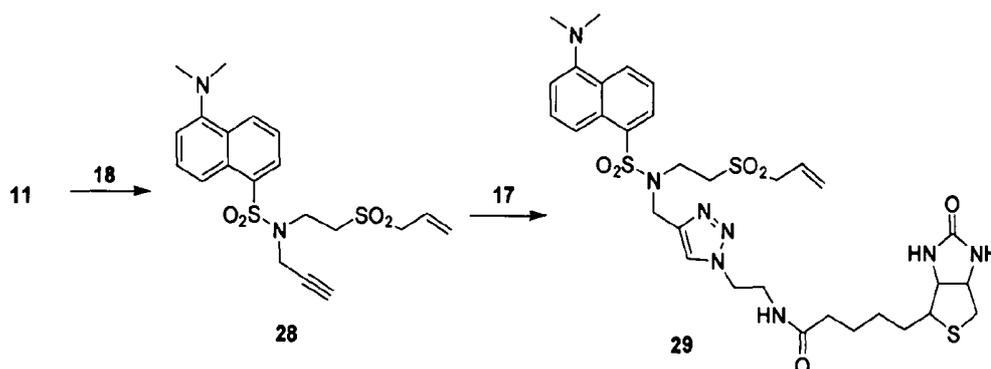
## Ejemplo 5.3

## Síntesis del agente de etiquetado 29

55

60

65



## ES 2 325 297 B1

Compuesto 28: A una disolución de 11 (160 mg, 0.84 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (20 mL) se le adicionó cloruro de dansilo 18 (680 mg, 2.52 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.71 mL, 5.02 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (1 día). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 2:3) obteniéndose 28 como un sirope (230 mg, 68%).

Compuesto 29: A una disolución de 28 (128 mg, 0.31 mmol) en MeOH (15 mL) se le adicionaron el compuesto 17 (89 mg, 0.29 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.080 mL, 0.57 mmol) y  $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$  (10 mg, 0.029 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (2 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 4:1) obteniéndose 29 como un sólido (188 mg, 92%).

### Ejemplo 6

#### *Etiquetado doble de proteínas con biotina-fluoróforo*

El etiquetado de proteínas se realiza según el siguiente protocolo general: una disolución de proteína en un tampón que no contenga aminas libres, como por ejemplo fosfato o HEPES, de fuerza iónica moderada (50-200 mM) y pH básico (7,5-8,7) se hace reaccionar con 5 moles de reactivo de marcaje por mol de proteína durante un tiempo suficiente (habitualmente durante toda la noche a temperatura ambiente). El exceso de reactivo se elimina mediante diálisis.

#### Ejemplo 6.1

##### *Etiquetado de albúmina sérica bovina (BSA) con el agente de etiquetado doble 25*

La BSA tiene un peso molecular de 66.4 kDa y 4.8 de punto isoeléctrico, es hidrosoluble y estable en solución por lo que es un buen modelo para estudiar las condiciones óptimas de marcaje. Se estudió la influencia de la temperatura (temperatura ambiente y a 37°C) y la estequiometría (reactivo marcaje:proteína 5:1, 10:1, 25:1 y 50:1) en la reacción de marcaje. Se analizó la eficacia del marcaje mediante electroforesis en SDS-PAGE y la fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ( $\lambda=365$  nm) (Fig. 1). El resultado muestra que tanto la temperatura como las elevadas estequiometrías provocan un incremento de peso molecular del enzima consecuencia de un mayor número de moléculas de reactivo de doble marcaje unido a la BSA, aunque a efectos de fluorescencia de "visu" no se observan diferencias significativas.

#### Ejemplo 6.2

##### *Etiquetado de albúmina humana (HSA) con el agente de etiquetado doble 29*

La albúmina sérica es la proteína más abundante en el sistema circulatorio, responsable del 80% de la presión oncótica de la sangre y el principal transportador de ácidos grasos, hormonas poco hidrosolubles o fármacos que de otra forma son insolubles en el suero. La reacción de marcaje se realizó durante 12 horas y agitación a 4°C en tampón carbonato 0.1 M pH 9 y con una estequiometría HSA:reactivo de marcaje 1:20. El exceso de agente de etiquetado doble se bloqueó con etanolamina y se eliminó mediante diálisis frente a tampón PBS.

La reacción de marcaje se puso de manifiesto mediante FRET. El experimento se realizó en un fluorímetro Shimadzu RF-5301 PC con una cubeta de cuarzo de 1 mL y 1 cm de paso de luz. La concentración de las muestras fue 0.1 mg/ml (en PBS). Se excitó a 280 nm que, es la longitud de onda de excitación del triptófano presente en la HSA, y se recogió el espectro de emisión desde 300 hasta 550 nm. Los resultados muestran que la proteína marcada presenta un espectro de emisión típico a 500-550 nm como consecuencia de la excitación del dansilo por la transmisión de la energía de fluorescencia emitida por el triptófano excitado a 280 nm de la propia proteína (Fig 2). Ni la proteína sin marcar ni el agente de etiquetado doble 29 presentan este máximo de fluorescencia cuando son excitados a 280 nm lo que demuestra la existencia de FRET en la proteína etiquetada.

#### Ejemplo 6.3

##### *Etiquetado de lisozima con el agente de etiquetado 25*

La lisozima de huevo tiene un peso molecular de 14.3 kDa, un punto isoeléctrico del orden de 11 y es soluble en agua. Su punto isoeléctrico y bajo peso molecular la hacen un buen modelo para complementar los estudios realizados con BSA. Se estudió la influencia de la temperatura (temperatura ambiente/37°C) y la estequiometría (reactivo marcaje:proteína 5:1, 10:1, 25:1 y 50:1) en la reacción de marcaje. Se analizó la eficacia del marcaje mediante electroforesis en SDS-PAGE y la fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ( $\lambda=365$  nm), comprobándose que tanto la temperatura como las elevadas estequiometrías provocan un descenso en la solubilidad consecuencia de un mayor número de moléculas de reactivo de doble marcaje unidas a lisozima. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la reacción de marcaje se llevó a cabo a temperatura ambiente y estequiometría 5:1.

## ES 2 325 297 B1

### Ejemplo 6.4.

#### *Peroxidasas de rábano picante y de alcachofa con los agentes de etiquetado doble 24, 25, 27 y 29*

5 Las peroxidasas son enzimas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno con la ayuda de un sustrato que pierde dos átomos de hidrógeno. Son utilizadas ampliamente en bioquímica clínica. Además, al tratarse de glicoproteínas son un buen modelo para evaluar la capacidad del reactivo de marcaje para reaccionar con proteínas protegidas por una “cubierta” de carbohidratos. Se seleccionaron las peroxidasas de rábano picante y alcachofa porque la primera es la peroxidasa de referencia en aplicaciones biotecnológicas y la segunda por presentar una gran resistencia a la acción de proteasas, probablemente como consecuencia de una mayor densidad de carbohidratos.

15 Se realizaron experimentos de marcaje de la peroxidasa de rábano picante con los reactivos 24 y 29 en tampón HEPES 100 mM pH 8.5 a dos temperaturas (temperatura ambiente y 37°C) y tres estequiometrías agente etiquetado:proteína (5:1, 10:1 y 50:1). La eficacia del marcaje se analizó mediante electroforesis en SDS-PAGE y la fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ( $\lambda=365$  nm). Los resultados ponen de manifiesto la importancia de la temperatura de marcaje, pues ninguna de las dos peroxidasas se marcó a temperatura ambiente independientemente de la estequiometría, pero sí a 37°C.

20 Se estudió el marcaje de 2 mg de ambas peroxidasas a 37°C (1 día) en tampón HEPES 100 mM, pH 8.5, con el reactivo 25 y estequiometrías proteína:reactivo de marcaje 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y la fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ( $\lambda=365$  nm). El reactivo de marcaje reacciona, aunque de manera dependiente de la estequiometría y de la peroxidasa: elevadas estequiometrías originaron mayor fluorescencia y la HRP (Fig 3A) se marca mejor que la peroxidasa de alcachofa (Fig 3B).

25 La HRP, 2 mg/mL en HEPES 100 mM, pH 8.5, se hizo reaccionar con los reactivos de marcaje 25 y 27 usando dos estequiometrías diferentes (proteína:reactivo de marcaje 1:25 y 1:50) y 37°C (1 día). Las muestras se dializaron frente a tampón fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM para eliminar el exceso de reactivo de marcaje y se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y la fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ( $\lambda=365$  nm).  
30 Ambos reactivos de marcaje reaccionaron (Fig 4), y al igual que en los casos anteriores, a mayor estequiometría mayor fluorescencia. Se analizó el efecto de la unión de los reactivos de doble etiquetado sobre la actividad y sobre la capacidad para interactuar con avidina. La actividad específica de las peroxidasa marcadas es del orden del 65% de las no marcadas, valor que está en el rango de lo descrito por el proveedor (SIGMA) para soluciones de peroxidasa en tampón pH 8 después de 10 días, que es el tiempo que transcurrió desde el comienzo del marcaje hasta el estudio de la actividad. La interacción con avidina se puso de manifiesto incubando avidina inmovilizada sobre pocillos de placas de ELISA con las enzimas marcadas, comprobándose, tras lavar, la presencia de actividad peroxidasa consecuencia de la interacción de la avidina con las peroxidasas vía la biotina del marcaje, demostrando la funcionalidad de la biotina de los reactivos de doble marcaje.

40

45

50

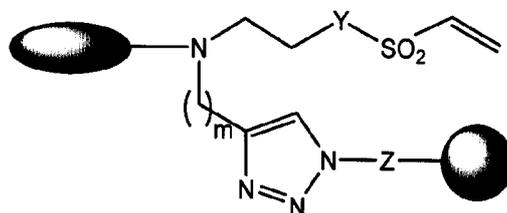
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

donde:

Y es el grupo  $-SO_2R-$  ó no existe; donde

R es un radical, sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), un dialquilarilo ( $(C_1-C_{10})Ar(C_1-C_{10})$ ) ó el grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ ; donde n toma valores de 2 a 20;

Z es un radical, sustituido o no sustituido, seleccionado del grupo que comprende un alquilo ( $C_1-C_{10}$ ), un dialquilarilo ( $(C_1-C_{10})Ar(C_1-C_{10})$ ) ó un grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ ; donde n toma valores de 2 a 20;

m toma valores de 1 a 20; y



representan, independientemente, una molécula etiqueta.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde las moléculas etiqueta se seleccionan de entre biotina, fluoróforo o cualquiera de sus derivados.

3. Compuesto según la reivindicación 2, donde el fluoróforo se selecciona de entre dansilo, fluoresceína, rodamina o cualquiera de sus derivados.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde Z es un alquilo ( $C_1-C_5$ ).

5. Compuesto según la reivindicación 4, donde Z es un grupo etilo.

6. Compuesto según la reivindicación 4, donde Z es un grupo metilo.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde m es 1.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde Y es el grupo  $-SO_2R$ .

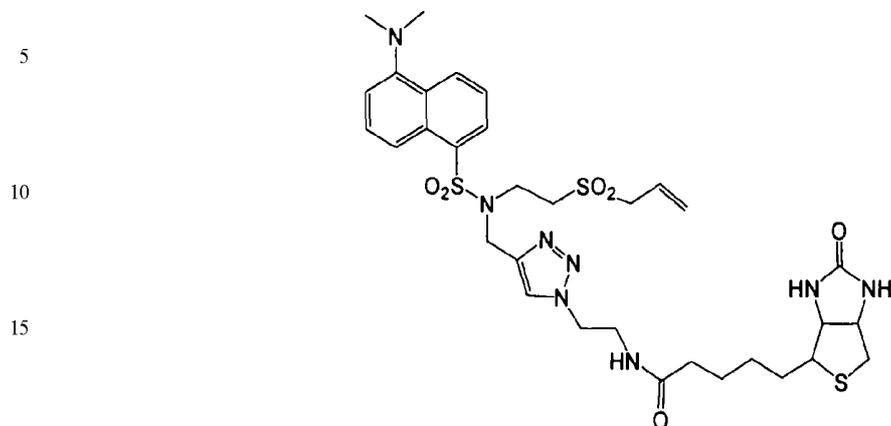
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde R es el grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ , n está definido en la reivindicación 1.

10. Compuesto según la reivindicación 9, donde n es 2.

11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde Y no existe.



15. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



16. Método de obtención de los compuestos de fórmula general (I) cuando Y es el grupo  $-SO_2R$  que comprende la reacción del compuesto de fórmula general (II)



donde R y m están definidos en la reivindicación 1

35 con una molécula etiqueta o cualquiera de sus derivados, que contienen un grupo ácido ó sulfónilo, antes o después de reaccionar con otra molécula etiqueta o cualquiera de sus derivados distinta a la anterior que contiene un grupo azido.

40 17. Método según la reivindicación 16, donde los derivados de las moléculas etiqueta que contienen un grupo ácido o sulfonilo son cloruros de ácido o cloruros de sulfonilo.

18. Método según la reivindicación 16, donde R es el grupo  $(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$ , n está definido en la reivindicación 1.

45 19. Método según la reivindicación 18, donde n es 2.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde m es 1.

50 21. Método de obtención de los compuestos de fórmula general (I), cuando

Y no existe, que comprende:

- 55 a. reacción del compuesto de fórmula general (III) con una molécula etiqueta o sus derivados, que contiene un grupo sulfonilo:



donde m está definido anteriormente; y

- 65 b. reacción del compuesto obtenido en el paso (a) con otra molécula etiqueta o sus derivados, distinta de la anterior y que contiene un grupo azido.

## ES 2 325 297 B1

22. Método según la reivindicación 21, donde los derivados de las moléculas etiqueta que contienen un grupo sulfonilo son cloruros de sulfonilo.

23. Método según la reivindicación 21, donde m es 1.

24. Uso de un compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 como agente de etiquetado.

25. Agente de etiquetado que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

26. Uso de un agente de etiquetado según la reivindicación 25 para el marcaje de biomoléculas.

27. Uso de un agente según la reivindicación 26, donde las biomoléculas son proteínas.

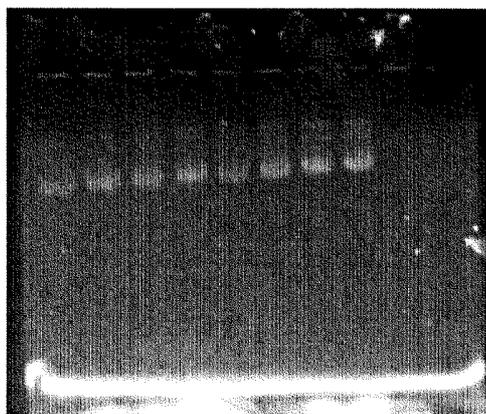


FIG. 1

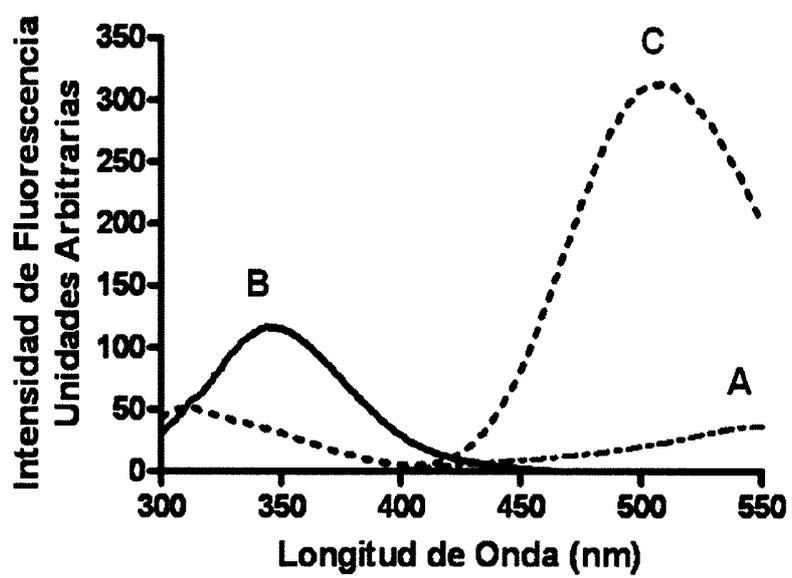
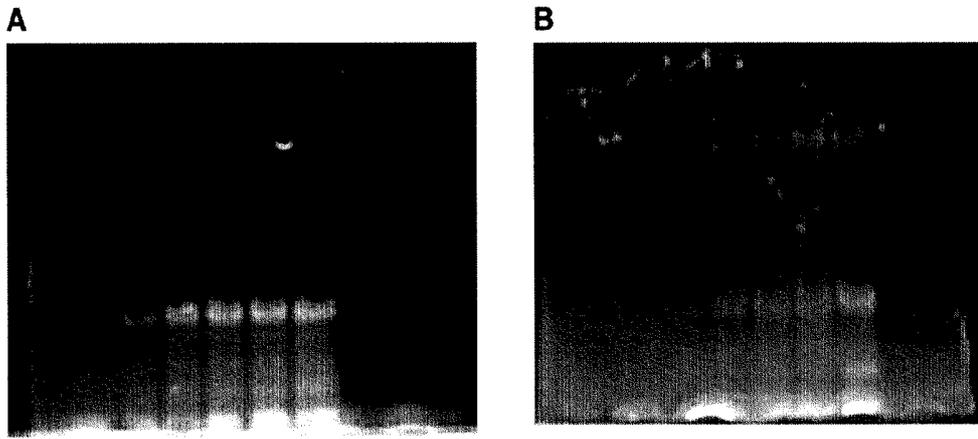


FIG. 2



**FIG. 3**



**FIG. 4**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 325 297

② Nº de solicitud: 200800592

③ Fecha de presentación de la solicitud: **29.02.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SPEERS, A.E. & CRAVATT, B.J. "Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods". Chemistry & Biology, 2004, Volumen 11, página 535-546. Ver página 535, columna 2; página 536, figura 1; página 537, figura 2.	1-27
A	ADAM, G.C. et al. "Trifunctional Chemical Probes for the Consolidated Detection and Identification of Enzyme Activities from Complex Proteomes". Molecular & Cellular Proteomics, 2002, Volumen 1, Número 10, páginas 828-835. Ver página 828, resumen; página 831, esquema 1.	1-27
A	HAGENSTEIN, M.C. & SEWALD, N. "Chemical Tools for Activity-Based Proteomics". Journal of Biotechnology, 2006, Volumen 124, páginas 56-73. Ver páginas 59-60, apartado 2; página 61, figura 3.	1-27
A	EVANS, M.J. & CRAVATT, B.F. "Mechanism-Based Profiling of Enzyme Families". Chemical Reviews, 2006, Volumen 106, páginas 3279-3301. Ver páginas 3292-3293, apartado 4.1.	1-27
A	VAN SWIETEN, P.F. et al. "Bioorthogonal Organic Chemistry in Living Cells: Novel Strategies for Labeling Biomolecules". Organic and Biomolecular Chemistry, 2005, Volumen 3, páginas 20-27. Ver página 22, esquema 2; página 25, figuras 5 y 6.	1-27

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

17.07.2009

Examinador

G. Esteban García

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D 249/04** (2006.01)

**C07D 495/04** (2006.01)

**C09B 62/503** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/531** (2006.01)

**G01N 33/533** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

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

C07D, C09B, 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, TXTE, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, NPL, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.07.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-27	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-27	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<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	Chemistry & Biology 2004, Vol. 11, pp. 535-546	2004
D02	Molecular & Cellular Proteomics 2002, Vol. 1, N° 10, pp. 828-835	2002

**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, su uso como agente de etiquetado, el agente de etiquetado que comprende el compuesto (I) y el uso de dicho agente de etiquetado para el marcaje de biomoléculas.

El documento D01 divulga sondas para la determinación de la actividad enzimática que consisten en un grupo reactivo que se une covalentemente a los sitios activos de la enzima y dos o más marcadores, como son biotina y/o un fluoróforo para la rápida detección y aislamiento de las enzimas etiquetadas (ver página 535, columna 2). Estas moléculas pueden obtenerse por conjugación entre la sonda y la molécula etiqueta, a través del acoplamiento entre los grupos azida y alquino presentes en cada una de ellas, de forma que la molécula resultante posee un anillo 1,2,3-triazol (ver página 536, figura 1). De esta forma, entre las sondas divulgadas (ver página 537, figura 2) se encuentra el compuesto resultante del acoplamiento entre una molécula que comprende biotina y rodamina como marcadores y un grupo alquino terminal (compuesto 6) o azida (compuesto 7), con el fenilsulfonato complementario, que comprende un grupo azida (compuesto 1), o un alquino terminal (compuestos 2 y 3).

Estas sondas poseerán, al igual que el compuesto de la invención, un anillo de 1,2,3-triazol, junto a biotina y rodamina, pero además de presentar una disposición diferente de estos grupos en la molécula, diferirán también en el grupo reactivo, que será fenilsulfonato, en lugar de vinilsulfona.

El documento D02 divulga compuestos trifuncionales útiles como sondas químicas proteómicas, que poseen simultáneamente dos marcadores que permiten, respectivamente, la detección y el aislamiento, junto a un grupo sulfonato reactivo (ver página 828, resumen). En concreto, en este documento se recoge el compuesto 1, que comprende biotina y rodamina (ver página 831, esquema 1). Sin embargo, este compuesto no posee el ciclo de 1,2,3-triazol presente en el compuesto de la invención, y además el grupo reactivo, al igual que ocurría en el producto divulgado en D01, es fenilsulfonato, en lugar de vinilsulfona.

Los documentos citados D01 y D02 muestran tan sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación, revela ni contiene sugerencia alguna que dirija al experto en la materia hacia el compuesto concreto de la invención, que presenta dos residuos derivados de moléculas etiqueta unidos a través de una cadena que incluye un anillo de 1,2,3-triazol y una vinilsulfona terminal como grupo reactivo (reivindicación 1); y, por tanto, tampoco hacia un método para su obtención (reivindicación 16); su uso como agente de etiquetado (reivindicación 24); al agente de etiquetado que lo comprende (reivindicación 25); y al uso de dicho agente para el marcaje de biomoléculas (reivindicación 26).

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones 1-27 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.