



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 293**

21 Número de solicitud: 200800576

51 Int. Cl.:

C07C 317/18 (2006.01) **C07C 317/28** (2006.01)

C07D 311/80 (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: **28.02.2008**

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 y
Ortega Muñoz, Mariano**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

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

57 Resumen:

Agentes de etiquetado simple basados en vinilsulfona. Agentes de etiquetado que comprenden un compuesto con una molécula etiqueta y un grupo vinilsulfona. Además, se refiere a los compuestos, el procedimiento de obtención de los mismos y sus usos en el marcaje de biomoléculas, y más concretamente de proteínas.

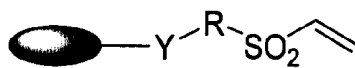
ES 2 325 293 B1

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

DESCRIPCIÓN

Agentes de etiquetado simple basados en vinilsulfona.

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) que comprende una molécula etiqueta y grupos vinilsulfona, cuya función es llevar a cabo la unión covalente con las moléculas susceptibles de etiquetado, también se refiere a sus procedimientos de obtención y a sus usos. Más particularmente, se refiere al uso de estos compuestos 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 (Wang, X., *et al. Biotechnol. Lett.* (2007), vol. 29, pp. 1599-1063), la plata (Rabilloud, T. *Electrophoresis* (1990), vol. 11 pp. 785-794), el oro coloidal (Rohringer, R.; Holden, D.W., *Anal. Biochem.* (1985), vol. 144, pp. 118-127) o la radioactividad (Waggoner, A., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2006), vol.10, pp. 62-66), 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 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), y 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.

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 | λ absorción | λ 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 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} 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:

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 ϵ -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,

ES 2 325 293 B1

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 imidazol. 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.

- 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-acrilquimilencarboxaldehído (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 maleimidas) 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.

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.

Grupo ácido carboxilo: 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 α,β -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 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).

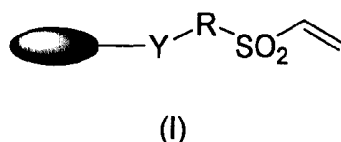
Sin embargo, desde un punto de vista biotecnológico su potencial va más allá. La reactividad de las vinilsulfonas con biomoléculas se ha aprovechado para la introducción de polietilenglicol vía reacción con tioles (Morpurgo, M., *et al.*, *Bioconj. Chem.* (1996) vol. 7, pp. 363-368), para la formación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

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

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 actualmente en proteómica y genómica para introducir un reactivo de etiquetado en biomoléculas.


Por lo 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 un radical seleccionado de entre un átomo de oxígeno (O) o del grupo, sustituido o no sustituido, $-N(R^1)CH_2CH_2SO_2$, donde: R^1 es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre el grupo que comprende un alquilo (C_1-C_{10}) o el grupo $(CH_2)_mC\equiv CH$; donde m es un valor de entre 1 y 10, preferiblemente m es un valor de 1 a 5, más preferiblemente m es 1, 2 ó 3, aún más preferiblemente m es 1. Cuando R^1 es un grupo alquilo, preferiblemente es un alquilo (C_2-C_6), más preferiblemente es un alquilo C_4 y aún más preferiblemente es un grupo sec-butilo.

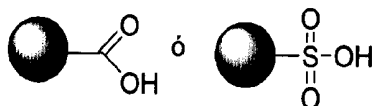
R es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona del grupo que comprende las siguientes fórmulas: $-R^2OCH_2CH_2$, $-CH_2CH_2OR^2OCH_2CH_2$, o $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$, donde R^2 es un radical alquilo (C_1-C_{10}), sustituido o no sustituido, ó un radical dialquilarilo ($(C_1-C_{10})Ar(C_1-C_{10})$), sustituido o no sustituido; y n es un valor de entre 2 y 20; preferiblemente R es un grupo de fórmula $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$, n puede ser un valor de 2 a 10, más preferiblemente n es 2, 3, 4, 5 ó 6; aún más preferiblemente n puede ser 2 ó 4; y

 representa una molécula etiqueta.

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.

Por "dialquilarilo" se entiende en la presente invención a un grupo arilo que está sustituido con dos grupos alquilo que tiene 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 tienen de 6 a 12 átomos de carbonos, pueden ser de anillo único ó múltiple, separados y/o condensados. Los grupos arilo típicos contiene 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.

El término "molécula etiqueta" se refiere en esta descripción 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 conteniendo al menos un grupo ácido carboxílico ó un grupo ácido sulfónico, a partir de ahora representados según las figuras:



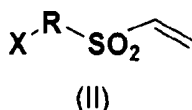
ES 2 325 293 B1

Más preferiblemente el fluoróforo puede ser 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.

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 las vinilsulfonas funcionalizadas de fórmula general (II), que presentan, además de un grupo vinilsulfona, uno o dos grupos funcionales adicionales para la unión con las moléculas de etiquetado:



donde:

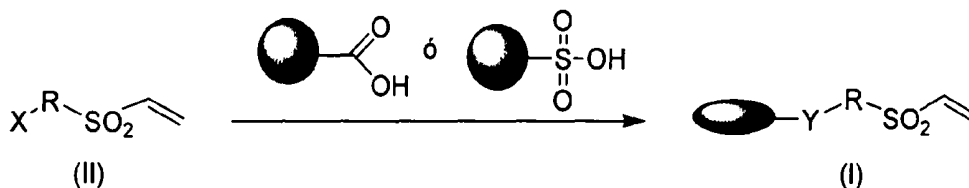
R está definido anteriormente; y

X es -OH o el grupo $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{R}^1)$; donde R^1 está definido anteriormente.

con una molécula etiqueta que contiene un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico que permite a través de ellos mismos o de uno de sus derivados activados la formación:

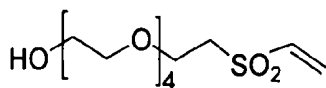
- de un enlace amida o sulfonamida con las vinilsulfonas de fórmula general (II) cuando X representa el grupo $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{R}^1)$; o

- de un enlace éster o sulfonato cuando X representa un grupo -OH; según el siguiente esquema:

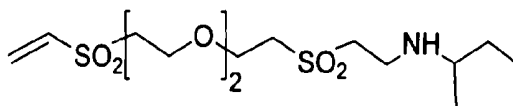


En una realización preferida de la presente invención, se utilizan cloruros de ácido o cloruros de sulfonilo derivados de las moléculas etiqueta y la obtención de los compuestos de la invención se lleva a cabo por reacción de estos derivados con las vinilsulfonas de fórmula general (II) a través de: a) reacciones de esterificación con cloruros de ácido de las etiquetas cuando X es -OH; b) reacciones de amidación con cloruros de ácido o cloruros de sulfonilo de las etiquetas cuando X es $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{R}^1)$. De esta forma se pueden obtener compuestos de etiquetado biotilantes y compuestos de etiquetado fluorescentes conteniendo dansilo ó rodamina como fluoróforos.

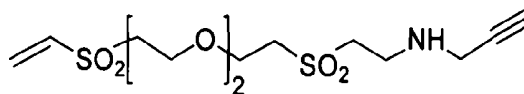
Una realización preferida del método de la presente invención comprende vinilsulfonas funcionalizadas de fórmula general (II) donde X es -OH, $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ó $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$; R es $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ y n puede tomar los valores de entre 2 y 4. Es decir, las vinilsulfona de fórmula general (II) preferidas son las siguientes:



4



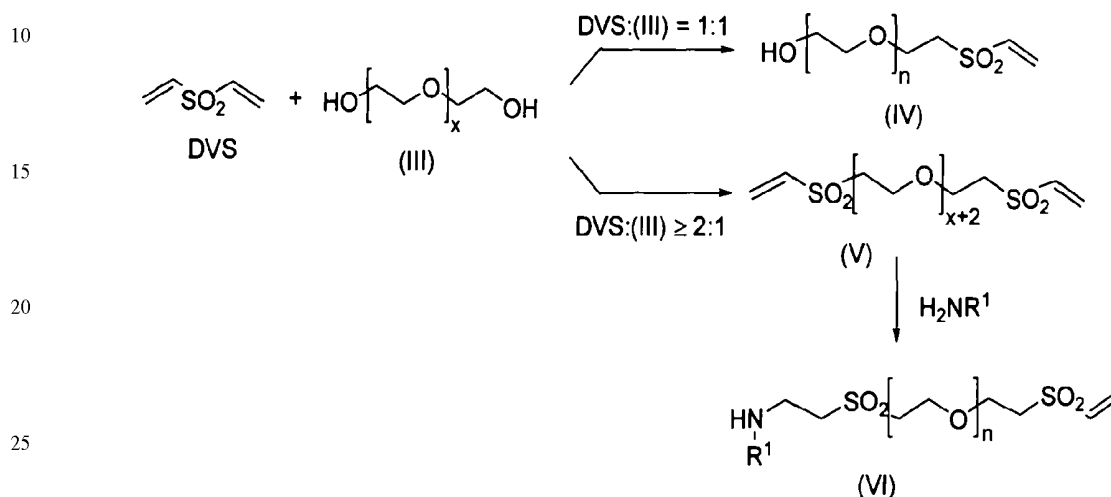
8



9

ES 2 325 293 B1

En otra realización preferida estos compuestos de fórmula general (II) se obtienen por reacción de divinilsulfona (DVS) con dioles (fórmula (III)): a) en una proporción 1:1 para dar la ω -hidroxi vinilsulfona, cuando X es -OH (corresponde al compuesto de fórmula general (IV)); ó b) en una proporción $\geq 2:1$ para dar bis-vinilsulfonas, correspondientes al compuesto de fórmula general (V), que son transformadas posteriormente por reacción de uno de los grupos vinil sulfona con aminas primarias a través de una reacción de adición tipo Michael dando las correspondientes amino vinilsulfona, es decir, los compuestos de fórmula general (II) cuando X es $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{R}^1)$, que corresponde, en el siguiente esquema, al compuesto de fórmula general (VI).



donde:

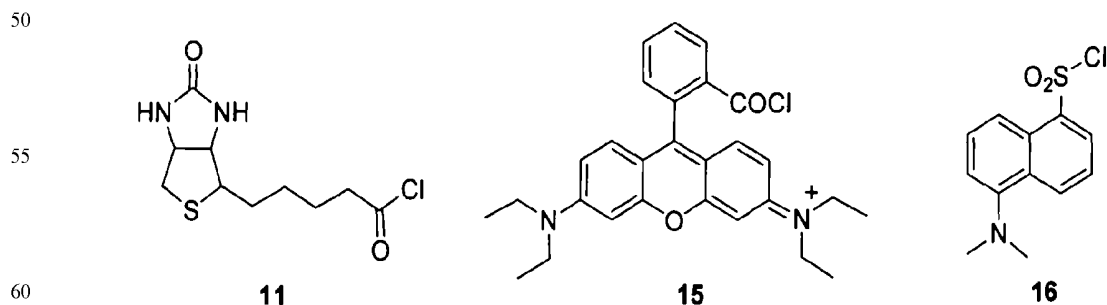
R^1 y n están definidos anteriormente.

x toma valores de 0 a 19 y, n está relacionado con x de la siguiente forma: n es x+1 en la fórmula general (IV) y n es x+2 en la fórmula general (VI).

En una realización aún más preferida, estos dioles son tetraetilenglicol (cuando x es 3) y etilenglicol (cuando x es 0).

De esta forma, se pueden proporcionar compuestos difuncionales (compuestos 4 y 8) y tri-funcionales (compuesto 9) con grupos que presentan una reactividad ortogonal entre sí, circunstancia que permite modular su reactividad. Así, según el método de la presente invención las vinilsulfonas de fórmula general (II) 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 hidroxilo y amino se pueden utilizar, pero sin limitarse a, derivados de moléculas etiqueta conteniendo a) la función cloruro de ácido o b) cloruro de sulfonilo.

De esta forma, los derivados de estas moléculas etiqueta preferidas pueden ser los siguientes:



El compuesto de la invención proporciona una técnica de etiquetado que se basa en la ligación quimioselectiva de la función vinilsulfona con grupos complementarios presentes de forma natural en cualquier biomolécula (grupos amino o grupos tioles) y con los que reacciona a través de reacciones de adición tipo Michael. Además, el compuesto es compatible con la naturaleza biológica de las biomoléculas y la técnica no requiere ninguna estrategia de activación.

ES 2 325 293 B1

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:

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

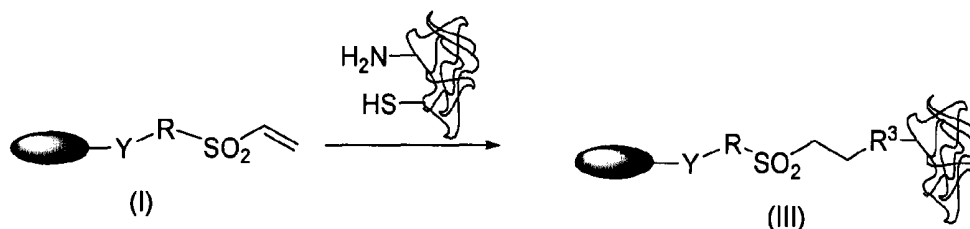
En una realización preferida de la presente invención, las biomoléculas son proteínas.

En una realización aún más preferida de la presente invención, las proteínas son seleccionadas del grupo que comprende albúmina sérica bovina (BSA), lisozima, GFP ("Green fluorescent protein"), Concanavalina A, Avidina ó extracto crudo de guisante.

En una realización preferida de la presente invención el etiquetado de proteínas se realiza en una solución sin aminas 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 la reacción con un exceso de los reactivos de etiquetado de fórmula general (I) durante un tiempo suficiente (habitualmente durante toda la noche a temperatura ambiente) eliminándose el exceso de reactivo mediante diálisis (Esquema 1).

Esquema 1

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



donde:

Y y R están definidos anteriormente;

R³ es NH o S; y



representa la biomolécula

ES 2 325 293 B1

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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra el marcaje de avidina con el compuesto 18, originando fluorescencia (gel de la izquierda (A)) y compatible con la posterior tinción con Coomassie (gel de la derecha (B)). Las muestras son, de izquierda a derecha:

calle 1: estequiometría 1:4 / 3 horas

calle 2: estequiometría 1:4 / 8 horas

calle 3: estequiometría 1:4 / 24 horas

calle 1: estequiometría 1:8 / 3 horas

calle 2: estequiometría 1:8 / 8 horas

calle 3: estequiometría 1:8 / 24 horas

Fig 2. Muestra el marcaje de concanavalina A con el compuesto 17, originando fluorescencia (gel de la izquierda (A)) y compatible con Coomassie (gel de la derecha (B)). Las muestras son, de izquierda a derecha:

calle 1: estequiometría 1:5 / 3 horas

calle 2: estequiometría 1:5 / 8 horas

calle 3: estequiometría 1:5 / 24 horas

calle 1: estequiometría 1:10 / 3 horas

calle 2: estequiometría 1:10 / 8 horas

calle 3: estequiometría 1:10 / 24 horas

Fig 3. Muestra el etiquetado previo a electroforesis de BSA y lisozima con el compuesto 17, originando fluorescencia (gel de la izquierda (A)) que permite detectar “de viso” del orden de 125 ng y es compatible con una posterior tinción de plata tras la electroforesis (gel de la derecha (B)). Las muestras son, de izquierda a derecha:

calle 1: BSA-rodamina

calle 2: lisozima-rodamina

calle 3: BSA sin etiquetar (control)

calle 4: lisozima sin etiquetar (control)

Fig 4. Muestra el etiquetado previo a electroforesis de un extracto crudo de guisante con el compuesto 17, permite su análisis sin necesidad de una posterior tinción con Coomassie o plata.

Fig 5. Muestra la detección de BSA marcada con biotina (estequiometrías BSA:biotina entre paréntesis) con diferentes estequiometrías de avidina fluorescente. De izquierda a derecha:

calle 1: Avidina-Dansilo: BSA-biotina (1:10) estequiometría 1:1

calle 2: Avidina-Dansilo: BSA-biotina (1:10) estequiometría 4:1

calle 3: Avidina-Dansilo: BSA-biotina (1:5) estequiometría 1:1

calle 4: Avidina-Dansilo: BSA-biotina (1:5) estequiometría 4:1

calle 5: Control de Avidina-Dansilo sin BSA-biotina

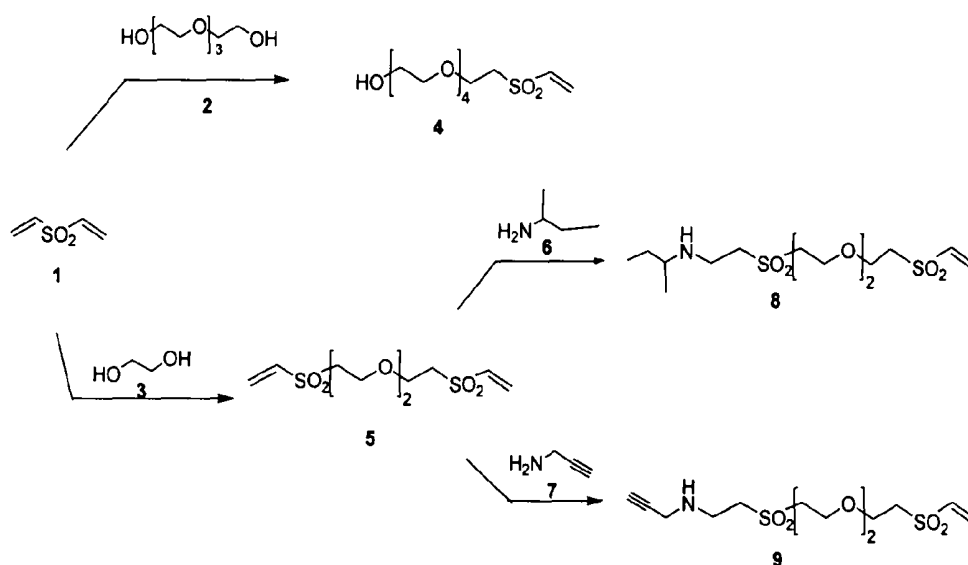
Ejemplos

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 de fórmula (II): compuestos 4, 8 y 9

Las vinilsulfonas de fórmula general (II) se obtuvieron a partir de divinilsulfona (DVS) y dioles, (a) en una proporción 1:1,2 para dar la ω -hidroxi vinilsulfona (compuesto 4) ó (b) en una proporción 3:1 para dar bis-vinilsulfonas (compuestos 5) que son transformadas posteriormente por reacción con aminas primarias de uno de los grupos vinil sulfona a través de una reacción de adición tipo Michael dando las correspondientes amino vinilsulfona (compuesto 8 y 9).



Compuesto 4: A una disolución de tetraetilenglicol 2 (1.760 g, 9.07 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL) se le adicionó DVS 1 (1.1 mL, 11 mmol) y DBU (690 mg, 4.5 mmol). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente (16 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1) obteniéndose 4 como un líquido (1.07 g, 38%).

Compuesto 5: A una disolución de etilenglicol 3 (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 5 como un sirope (800 mg, 51%).

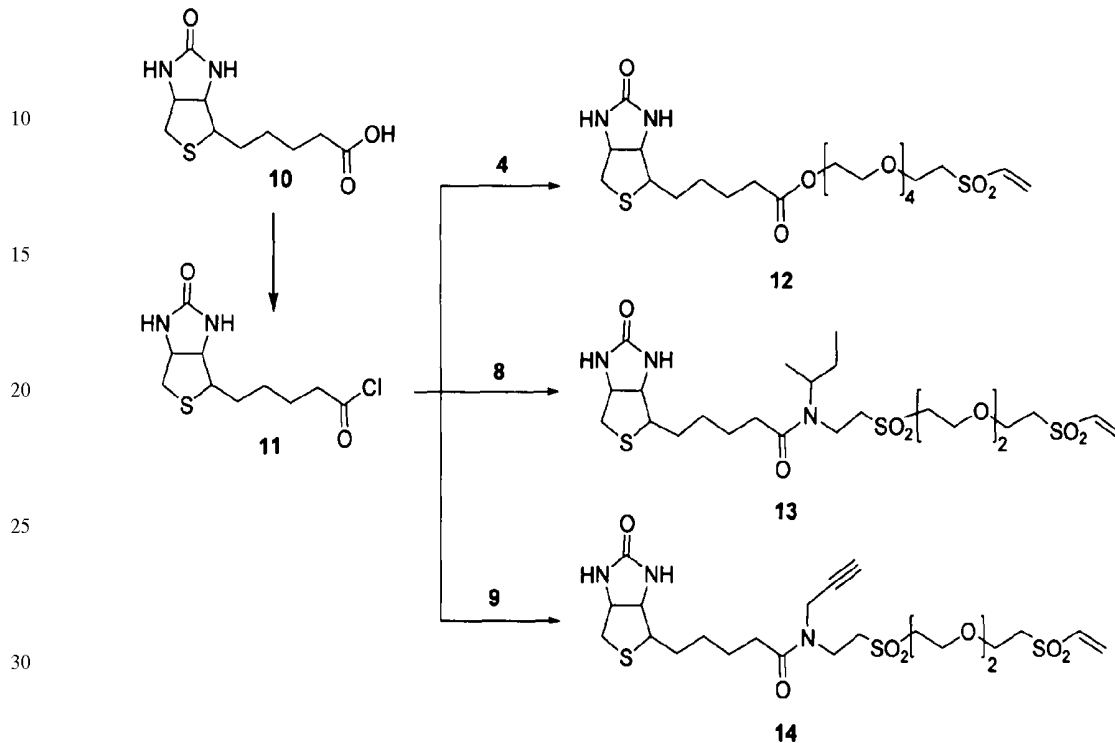
Compuesto 8: A una disolución de 5 (1.0 g, 3.3 mmol) en Cl_2CH_2 -isopropanol 2:1 se le adicionó sec-butilamina 6 (164 mg, 2.2 mmol). La mezcla de reacción se deja a temperatura ambiente (6 h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío obteniéndose un crudo que se purificó por cromatografía en columna (AcOEt a AcOEt-MeOH 10:1) obteniéndose 8 como un sirope (472 mg, 57%).

Compuesto 9: A una disolución de 5 (414 mg, 1.4 mmol) en Cl_2CH_2 -isopropanol 2:1 se le adicionó propargilamina 7 (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 9 como un sirope (170 mg, 52%).

Ejemplo 2

Síntesis de agentes de etiquetado simple basados en vinil sulfona conteniendo biotina: compuestos 12-14

5



15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Compuesto 12: Una disolución de biotina 10 (247 mg, 1 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente (1 h). El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El crudo obtenido fue el cloro derivado 11 que se disolvió en CH_2Cl_2 anhidro (15 mL), se enfrió en un baño de agua-hielo y se le adicionaron 4 (343 mg, 1.1 mmol) y Et_3N (0.145 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 (CH_2Cl_2 -MeOH 20:1) obteniéndose 12 como un sirope (234 mg, 42%).

Compuesto 13: Una disolución de biotina 10 (120 mg, 1 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente (1h). El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El crudo obtenido fue el cloro derivado 11 que se disolvieron en THE anhidro (15 mL), se enfrió en un baño de agua-hielo y se le adicionaron 8 (145 mg, 1.2 mmol) y Et_3N (0.085 mL) disueltos en THE anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min procediéndose entonces a la eliminación del disolvente por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1 a 5:1) obteniéndose 13 como un sirope (140 mg, 63%).

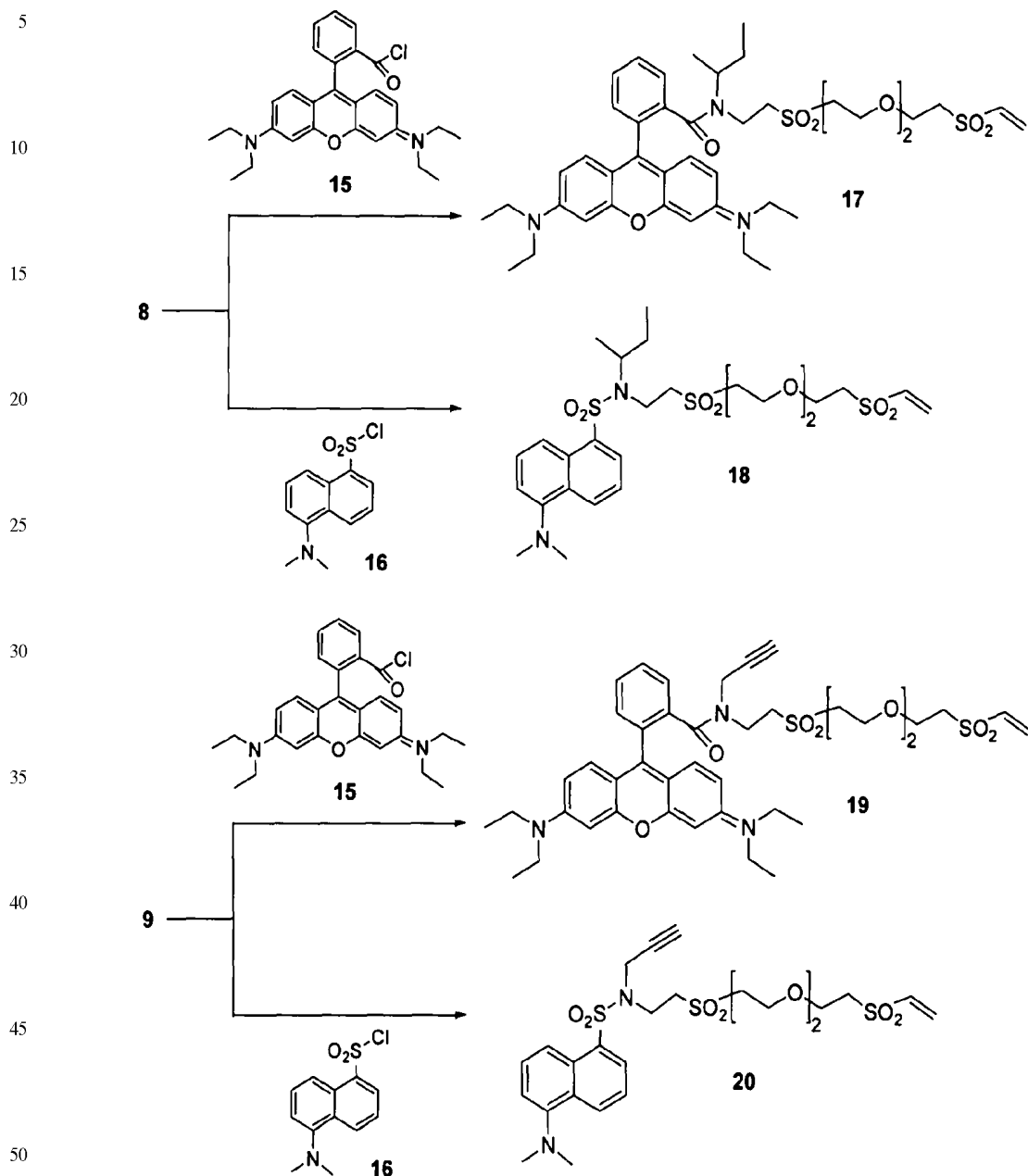
Compuesto 14: Una disolución de biotina 10 (200 mg, 0.82 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente (1 h). El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El crudo obtenido fue el cloro derivado 11 que se disolvieron en THE anhidro (15 mL), se enfrió en un baño de agua-hielo y se le adicionaron 9 (353 mg, 1 mmol) y Et_3N (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 14 como un sirope (438 mg, 92%).

60

65

Ejemplo 3

Síntesis de agentes de etiquetado simple basados en vinil sulfona conteniendo fluoróforos: compuestos 17, 18, 19 y 20



Compuesto 17: Una disolución de rodamina B (100 mg, 0.2 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente (1 día). El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El crudo obtenido fue el cloro derivado 15 que se disolvió en THF anhidro (15 mL), se le adicionó 8 (64 mg, 0.17 mmol) y Et_3N (0.050 mL) disueltos en THF anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min procediéndose entonces a la eliminación del disolvente por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 30:1 a 10:1) obteniéndose 17 como un sirope (64 mg, 44%).

Compuesto 18: A una disolución de cloruro de dansilo 16 (130 mg, 0.48 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 mL) se le adicionaron 8 (150 mg, 0.40 mmol) y Et_3N (0.115 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente (2 días) procediéndose entonces a la eliminación del disolvente por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:1 a 3:1) obteniéndose 18 como un sirope (182 mg, 74%).

Compuesto 19: Una disolución de rodamina B (195 mg, 0.41 mmol) en POCl_3 (5 mL) y 1,2-dicloroetano (5 mL) se mantuvo a reflujo (16 h). El exceso de POCl_3 y el disolvente se eliminaron por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El crudo obtenido contenía el cloruro de rodamina 15 que fue usado directamente

ES 2 325 293 B1

por disolución en THF anhidro (15 mL). Se enfrió en un baño de agua-hielo y se le adicionaron 9 (174 mg, 0.49 mmol) y Et₃N (0.174 mL, 1.22 mmol) disueltos en THF 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 (Cl₂CH₂-MeOH 20:1) obteniéndose 19 como un sólido (272 mg, 86%).

Compuesto 20: A una disolución de cloruro de dansilo 16 (275 mg, 1.0 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 mL) se le adicionaron 9 (180 mg, 0.50 mmol) y Et₃N (0.150 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente (3 días) procediéndose entonces a la eliminación del disolvente por evaporación a vacío. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:1 a 3:1) obteniéndose 20 como un sirope (252 mg, 84%).

Ejemplo 4

Etiquetado simple de proteínas con agentes de etiquetado biotinados

Ejemplo 4.1

Etiquetado de la albúmina sérica bovina (BSA) con el compuesto 13

La albúmina sérica bovina (BSA) comercial (SIGMA A4503) (0.15 mM en agua) se incubó con compuesto 13 (25.1 mM en 1:1 DMSO:agua) con una estequiometría 1:5 y 1:10 durante 3 horas, transcurridas las cuales se eliminó mediante diálisis el exceso de producto 13. Para evaluar si la BSA marcada con biotina es reconocida por avidina, se incubó con avidina fluorescente (ejemplo 5.1) según las estequiometrías avidina:BSA 4:1 y 1:1 durante 30 minutos y se analizó mediante SDS-PAGE con desnaturalización suave (2 minutos a 100°C). La fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ($\lambda=365$ nm) y la proteína se detectó mediante Coomassie (Fig 5). El resultado demuestra que la avidina fluorescente del ejemplo 5.1 reconoce a la BSA marcada con biotina y forma complejos estables de elevado peso molecular que no entran en el gel separador (14% acrilamida).

Ejemplo 4.2

Etiquetado de Green Fluorescent Protein (GFP) con el compuesto 12

La proteína GFP se obtuvo a partir de una cepa de *E. coli* que fue transformada con el plásmido pGFPCR que codifica para la variante UV de la GFP. Una vez lisadas las bacterias, la proteína es purificada utilizando una columna IMAC. La proteína purificada (2 mg/ml) se dializó frente a PBS y se incubó con un exceso de 20 veces de reactivo biotinilante 12 (considerando que la proteína GFP tiene un peso molecular de 27000). La incubación se mantuvo a 4°C durante 12 h y el exceso de reactivo se bloqueó por adición de etanolamina. Esta muestra es dializada posteriormente frente a tampón PBS. La muestra así obtenida se utilizó directamente en una cromatografía de afinidad sobre una columna de biotina-silica (según la solicitud de patente española: P200701850) saturada de avidina utilizando un sistema de microfiltro con sólo 100 mg de la silica funcionalizada. La elución se realizó con HCl 0.2 N y el eluato, tras ser liofilizado se ha analizado mediante espectrometría MALDI-TOF que muestra valores de peso molecular 14295.1 (monómero de avidina) y 28565 (una molécula de GFP modificada con 4 biotinas).

Ejemplo 5

Etiquetado simple de proteínas con agentes de etiquetado fluoróforos

Ejemplo 5.1

Etiquetado de avidina con el compuesto 18

La avidina comercial (SIGMA A9275) (0.35 mM en agua) se incubó con el compuesto 18 (24.8 mM en 1:1 DMSO:agua) con una estequiometría 1:4 y 1:8 durante 3, 8 y 24 horas en HEPES 50 mM pH 8 y se analizó el resultado en SDS-PAGE. La fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ($\lambda=365$ nm) y la proteína se detectó mediante Coomassie (Fig. 1). El tiempo óptimo de marcaje fue del orden de 8 horas, aunque con 3 horas de reacción ya se puede detectar la fluorescencia. El marcaje es compatible con la detección mediante Coomassie y no altera la capacidad de la avidina marcada para interactuar con biotina.

Ejemplo 5.2

Etiquetado de Concanavalina A con el compuesto 17

La concanavalina A comercial (SIGMA L7647) (0.39 mM en agua) se incubó con compuesto 17 (18 mM en 1:1 DMSO:agua) con una estequiometría 1:5 y 1:10 durante 3, 8 y 24 horas en HEPES 50 mM pH 8 y se analizó el resultado en SDS-PAGE (Fig. 2). La fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ($\lambda=365$ nm) y la proteína se detectó mediante Coomassie. La fluorescencia fue tan intensa que no se apreciaban diferencias en función del tiempo. Elevadas estequiometrías y tiempos de reacción promovían la precipitación de la muestra. El marcaje fue compatible con la detección mediante Coomassie.

ES 2 325 293 B1

Ejemplo 5.3

Etiquetado previo a electroforesis de BSA y lisozima con rodamina como alternativa a las tinciones con Coomassie o plata de geles de electroforesis

5

Se evaluó la viabilidad del marcaje fluorescente previo a la electroforesis mediante la reacción durante 10 minutos a 100°C de 33 microgramos de las proteínas modelo albúmina sérica bovina comercial (SIGMA A4503) y lisozima de huevo con 3 microgramos del compuesto 17 en tampón HEPES 120 mM pH 8.8. A continuación se añadieron 100 microlitros de tampón de carga (Tris-HCl 65.8 mM pH 6.8, glicerol 26% (v/v), SDS 2.1% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (w/v)). Se analizó el resultado en SDS-PAGE (Fig. 3). La fluorescencia se visualizó con un transiluminador comercial ($\lambda=365$ nm) y la proteína se detectó mediante tinción de plata. El marcaje fue compatible con la posterior detección mediante tinción de plata y no alteraba el patrón de migración de ninguna de las dos proteínas. El límite de detección “de visu” es del orden de 125 ng para ambas proteínas.

15 Ejemplo 5.4

Etiquetado de un extracto crudo de guisante con rodamina como alternativa a las tinciones con Coomassie o plata de geles de electroforesis

20 Se marcaron 52 microgramos de un extracto de guisante con 3, 6 y 9 microgramos del compuesto 17 mediante incubación durante 10 minutos a 100°C en HEPES 331 mM pH 8.8. A continuación se añadieron 30 microlitros de tampón de carga y se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) (Fig 4). El resultado fue el típico de un extracto crudo, confirmando la universalidad del marcaje, la viabilidad como sistema de marcaje fluorescente previo a la electroforesis y la compatibilidad con la posterior tinción de Coomassie y/o plata.

25

30

35

40

45

50

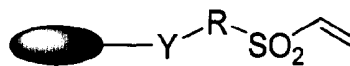
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



(I)

donde:

Y es oxígeno (O) ó el grupo $-N(R^1)CH_2CH_2SO_2$; donde

R^1 es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre un grupo alquilo (C_1-C_{10}) o un grupo $(CH_2)_mC\equiv CH$; donde

m toma valores de 1 a 10;

R es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona del grupo que comprende: $-R^2OCH_2CH_2$, $CH_2CH_2OR^2$ ó $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$; donde

R^2 es un radical, sustituido o no sustituido, que se selecciona de entre un grupo alquilo (C_1-C_{10}) ó un grupo dialquilarilo; donde

n toma valores de 2 a 20; y

representa una molécula etiqueta.

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

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

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R es $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$.

5. Compuesto según la reivindicación 4, donde n toma valores de 1 a 3.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde Y es oxígeno (O).

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde Y es el grupo $-N(R^1)CH_2CH_2SO_2$ y R^1 está definido en la reivindicación 1.

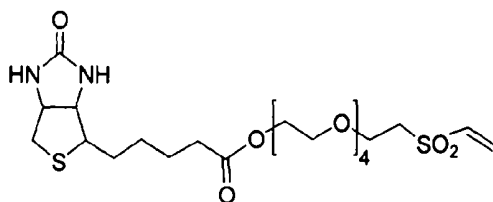
8. Compuesto según la reivindicación 7, donde R^1 es un alquilo (C_2-C_6).

9. Compuesto según la reivindicación 8, donde R^1 es sec-butilo.

10. Compuesto según la reivindicación 7, donde R^1 es grupo $(CH_2)_mC\equiv CH$ y m toma los valores de 1 a 3.

11. Compuesto según la reivindicación 10, donde m es 1.

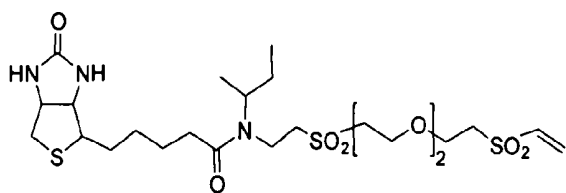
12. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



ES 2 325 293 B1

13. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

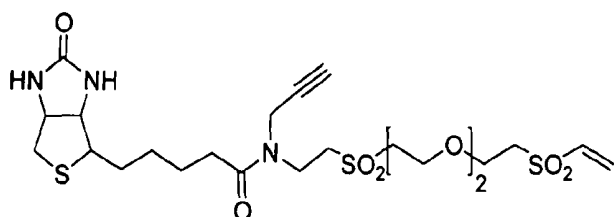
5



10

14. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

15

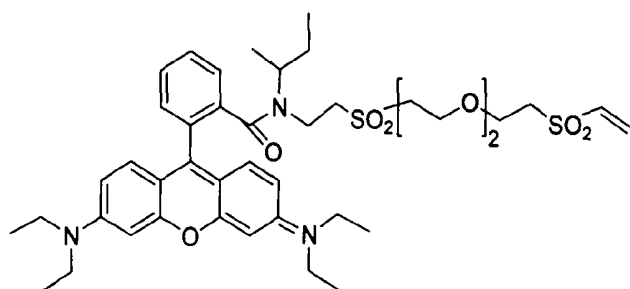


20

25

15. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

30

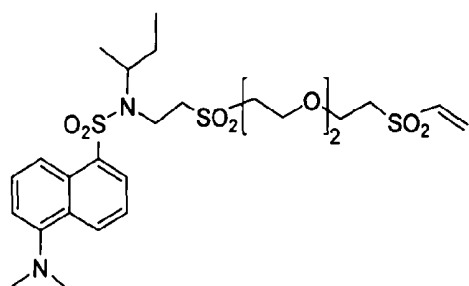


35

40

16. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

45

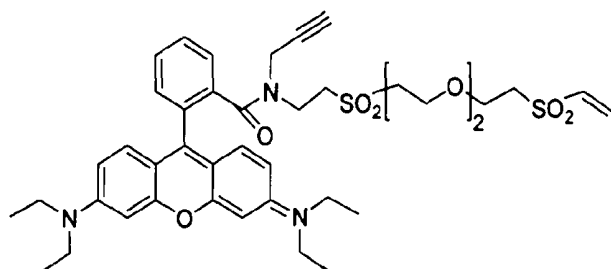


50

55

17. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

60



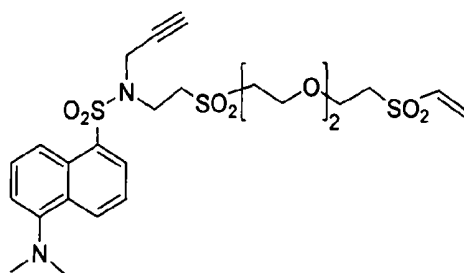
65

ES 2 325 293 B1

18. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

5

10

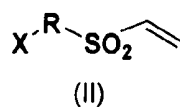


15

19. Método de obtención de un compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende la reacción de:

a. el compuesto de fórmula general (II):

20



25

donde

R está definido en la reivindicación 1; y

30

X es OH ó el grupo $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{R}^1)$; donde R^1 está definido en la reivindicación 1.

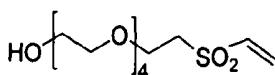
b. con una molécula etiqueta o cualquiera de sus derivados.

35

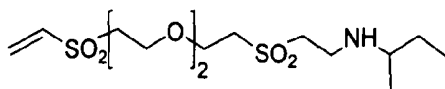
20. Método según la reivindicación 19, donde los derivados de las moléculas etiqueta son cloruros de ácido o cloruros de sulfonilo.

21. Método según la reivindicación 19, donde la vinilsulfona funcionalizada del paso (a) se selecciona de entre los compuestos de fórmula:

40

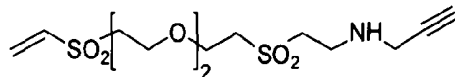


45



50

ó



55

22. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, como agente de etiquetado.

23. Agente de etiquetado que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

60

24. Uso del agente de etiquetado según la reivindicación 23, para el marcaje de biomoléculas.

25. Uso del agente de etiquetado según la reivindicación 24, donde las biomoléculas son proteínas.

65

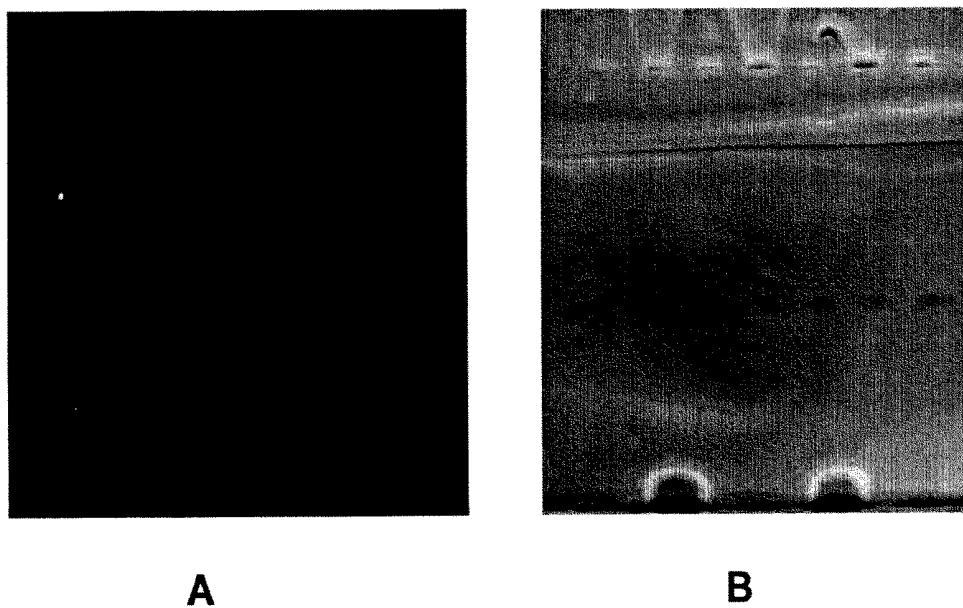


FIG. 1

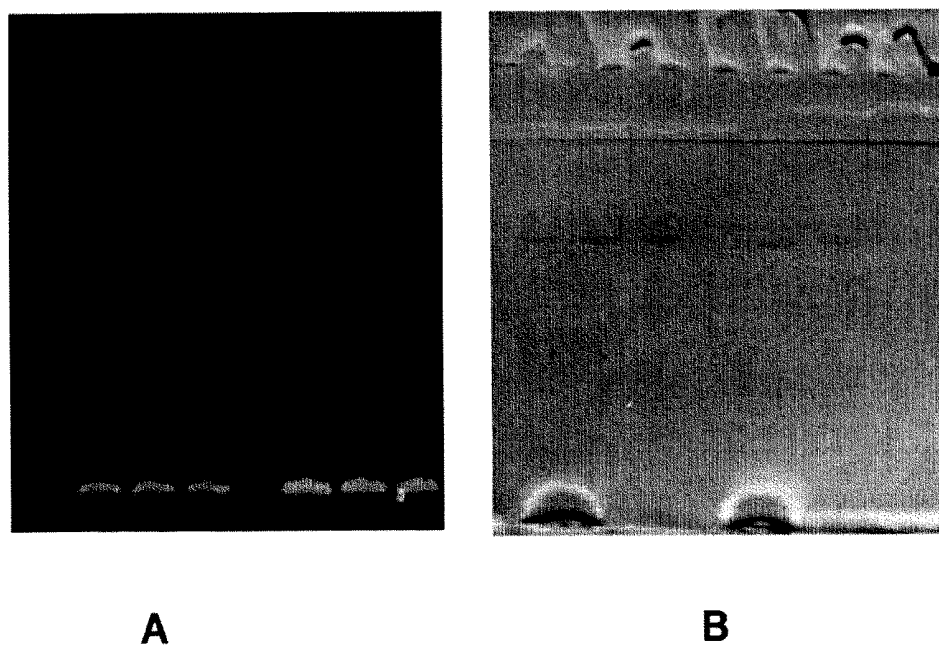


FIG. 2

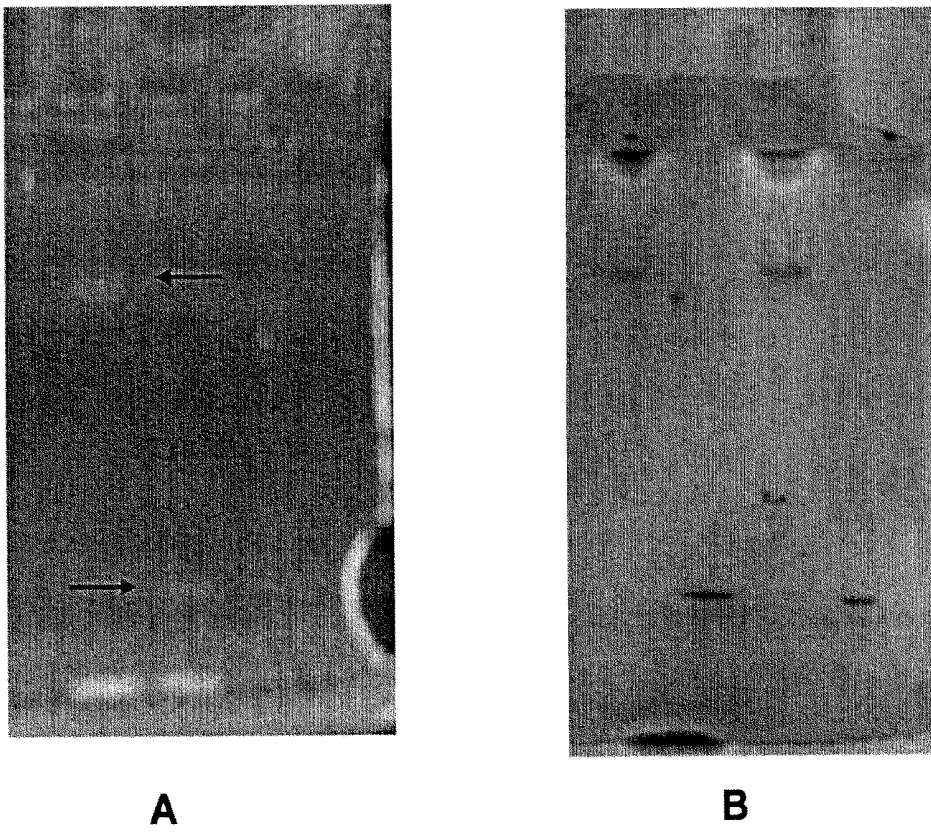


FIG. 3

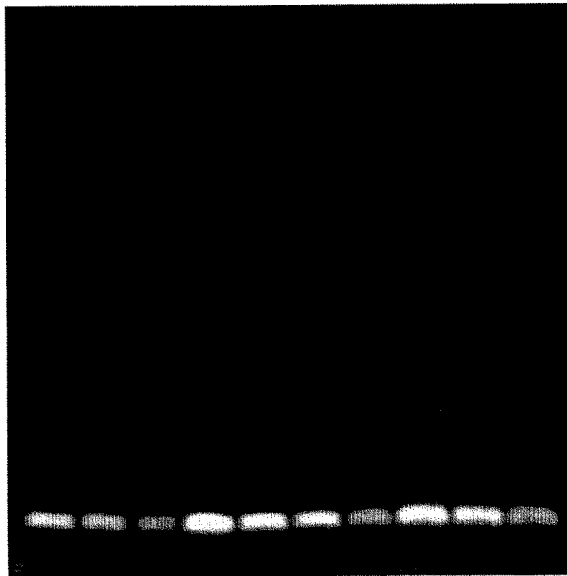


FIG. 4

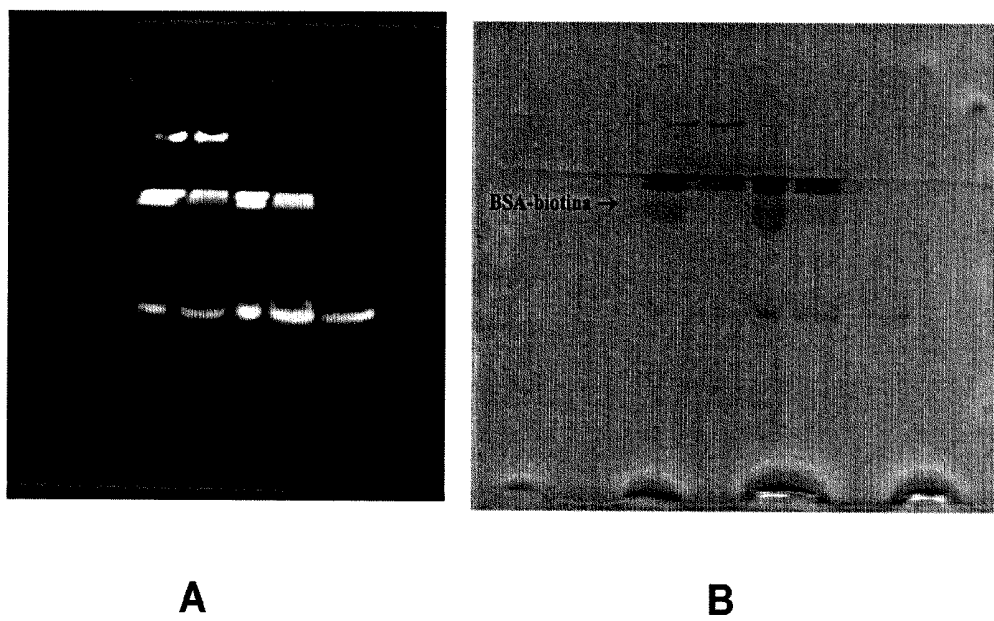


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 325 293

② Nº de solicitud: 200800576

② Fecha de presentación de la solicitud: 28.02.2008

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 |
|-----------|--|----------------------------|
| A | SHIMOBOJI, T. et al. "Mechanistic Investigation of Smart Polymer-Protein Conjugates". Bioconjugate Chemistry, 2001, Volumen 12, Número 2, página 314-319. Ver página 314, resumen; página 315, figura 1. | 1-25 |
| A | EP 0187076 B1 (CENTRE DE LA RESERCHE SCIENTIFIQUE, CNRS) 18.09.1991, reivindicaciones; compuesto II. | 1-25 |
| A | HAGENSTEIN, M. & SEWALD, N. "Chemical tools for activity-base proteomics". Journal of Biotechnology, 2006, Volumen 124, páginas 56-73. Ver páginas 59-60, apartado 2; página 61, figura 3. | 1-25 |
| A | WO 2003084982 A2 (LUMINEX CORPORATION) 16.10.2003, página 2, líneas 9-12; reivindicación 1; página 45, tabla 2. | 1-25 |

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

16.07.2009

Examinador

G. Esteban García

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 317/18 (2006.01)

C07C 317/28 (2006.01)

C07D 311/80 (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)

C07C, 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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.07.2009

Declaración

| | | |
|--|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-25 | SÍ |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-25 | SÍ |
| | Reivindicaciones | NO |

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

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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 | Bioconjugate Chemistry 2001, Vol. 12, N° 2, pp. 314-319 | 2001 |
| D02 | EP 0187076 B1 | 18.09.1991 |
| D03 | Journal of Biotechnology 2006, Vol. 124, pp. 56-73 | 2006 |
| D04 | WO 2003/084982 A2 | 16.10.2003 |

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 un polímero de N,N-dimetilacrilamida (DMA) y 4-fenilazofenilacrilato que presenta, además del grupo azo cromóforo, un grupo vinilsulfona terminal, que le permite conjugarse con streptavidina a través del grupo tiol de un residuo de cisteína de la misma y, de esta manera, tener aplicaciones diagnósticas (ver página 314, resumen; página 315, figura 1).

El documento D02 divulga reactivos fluorescentes derivados de 4-aminonaftilimida que presentan un grupo vinilsulfona terminal y son susceptibles de aplicación en inmunoensayos debido a su capacidad para acoplarse con haptenos, antígenos o fragmentos de anticuerpos (ver reivindicaciones, compuesto II).

El documento D03 divulga sondas utilizadas en proteómica que comprenden al menos un grupo marcador o etiqueta, que sirve para la visualización y/o purificación, acoplado, a través de un espaciador o "linker", a un grupo reactivo capaz de establecer una unión covalente a una proteína (ver páginas 59-60, apartado 2; página 61, figura 3). Como marcador se puede utilizar biotina o un grupo fluorescente, como rodamina (página 60, apartado 2.1), y como "linker", una cadena alquílica o polietilenglicol (página 60, apartado 2.2).

El documento D04 divulga, de forma general, el acoplamiento covalente de dos o más entidades, tales como biomoléculas, polímeros y moléculas orgánicas o inorgánicas, a través de uno o más grupos reactivos unidos a grupos espaciadores (página 2, líneas 9-12). Entre estas entidades se encuentran una vinilsulfona terminal, que se une al menos a una biomolécula (enzima, anticuerpo, proteína, DNA ó RNA, entre otros) y a un cromóforo o fluoróforo, a través de un espaciador o "linker" (ver reivindicación 1), que puede ser polietilenglicol (página 45, tabla 2, entrada 1).

Los documentos citados D01-D04 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 una vinilsulfona terminal unida a una molécula etiqueta a través de un radical de oxialquileno determinado (reivindicación 1); y, por tanto, tampoco hacia un método para su obtención (reivindicación 19); su uso como agente de etiquetado (reivindicación 22); al agente de etiquetado que lo comprende (reivindicación 23); y al uso de dicho agente para el marcaje de biomoléculas (reivindicación 24).

En consecuencia, se considera que la invención definida en las reivindicaciones 1-25 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.