



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 345 809**

② Número de solicitud: 200930022

⑤ Int. Cl.:  
**C07C 237/50** (2006.01)  
**C07C 237/26** (2006.01)  
**G01N 21/64** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **31.03.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.10.2010**

⑰ Solicitante/s: **Universitat de les Illes Balears  
Campus Universitario  
Ctra. de Valldemosa, Km. 7,5  
Edifici Son Lledó  
07071 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES**

⑱ Inventor/es: **Morey Salvà, Jeroni;  
Piña Capo, María de las Nieves;  
Costa Torres, Antonio y  
Deyà Serra, Pedro María**

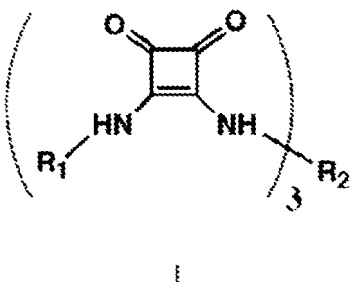
⑳ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑳ Título: **Compuesto tripodal de base escuaramida, proceso de obtención, sistema quimiosensor que lo contiene y procedimiento para la detección de policarboxilatos.**

㉑ Resumen:

Compuesto tripodal de base escuaramida, proceso de obtención, sistema quimiosensor que lo contiene y procedimiento para la detección de policarboxilatos.

La presente invención se refiere a un compuesto tripodal de base escuaramida junto con su proceso de obtención, al sistema quimiosensor que contiene a dicho compuesto como receptor, y a un procedimiento que utiliza dicho sistema quimiosensor para la detección cualitativa y/o cuantitativa de policarboxilatos, concretamente dicarboxilatos y tricarboxilatos, preferiblemente folato y análogos del mismo, de una manera rápida, simple, eficaz en muestras comerciales en agua.



ES 2 345 809 A1

**DESCRIPCIÓN**

Compuesto tripodal de base escuaramida, proceso de obtención, sistema quimiosensor que lo contiene y procedimiento para la detección de policarboxilatos.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto tripodal de base escuaramida junto con su proceso de obtención, al sistema quimiosensor que contiene a dicho compuesto como receptor, y a un procedimiento que utiliza dicho sistema quimiosensor para la detección cualitativa y/o cuantitativa de policarboxilatos, concretamente dicarboxilatos y tricarboxilatos, preferiblemente folato y análogos del mismo.

**Antecedentes de la invención**

La coordinación selectiva de iones en un medio altamente competitivo, como el agua, ha cautivado al químico durante años. El reconocimiento molecular de aniones biológicamente activos, como fosfatos o carboxilatos, ha sido un foco de atención prioritario en la investigación con el ánimo de mimetizar las enzimas o las proteínas de transporte. Este tipo de investigaciones se dirigen hacia el establecimiento de una mayor coordinación y selectividad entre receptor y sustrato. El primer aspecto viene controlado por el tipo de grupos funcionales y disolvente utilizados. Mientras que el segundo aspecto, viene sujeto por la introducción de elementos complementarios a la geometría y las características propias de coordinación del sustrato.

A pesar del elevado grado de sofisticación alcanzado actualmente en este tipo de investigaciones, el desarrollo de nuevos receptores capaces de establecer una fuerte coordinación selectiva con aniones en un disolvente, de elevada constante dieléctrica, como el agua, sigue siendo una tarea hartamente difícil.

Es bien sabido en la técnica que las escuaramidas son consideradas vinilógicas a las amidas y son una unidad estructural muy adecuada para el establecimiento de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Este hecho se fundamenta en que una escuaramida disecundaria ofrece dos grupos NH aceptores de enlace de hidrógeno y dos átomos de oxígeno carbonílicos donadores de enlace de hidrógeno intermoleculares, dispuestos de forma que puedan actuar bien por separado, o en ciertos casos de forma sinérgica. A esto debemos añadir que cálculos teóricos avalan que el ciclo de escuaramida al formar enlaces de hidrógeno intermoleculares con aniones, o bien con cationes, provoca en el ciclo escuaramídico, y en consecuencia en toda la molécula, un incremento de estabilidad cercana a la aromaticidad. Todo ello reunido hace que la unidad de escuaramida disecundaria sea una prometedora unidad de enlace con restos carboxilatos. Está sólidamente fundamentado en la bibliografía, que el diseño de un receptor para aniones policarboxilatos en agua debe reunir una gran preorganización, capacidad de formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, establecimiento de fuerzas intermoleculares no covalentes diferentes y complementarias a las de enlace de hidrógeno, como electrostáticas, y ser perfectamente soluble en agua. Por otro lado, los grupos amonio han demostrado ser irris efectivos para la formación de pares iónicos que los grupos guanidinio debido a su elevada localización de la carga positiva, de esta forma, la naturaleza muestra preferencia por la arginina más que la lisina para enlazar con este tipo de aniones, posiblemente debido a una mayor acumulación de enlaces de hidrógeno.

No debemos olvidar que la naturaleza del disolvente juega un papel crítico en el control de la fuerza de coordinación y selectividad entre receptor-analito. Estas interacciones generalmente están dominadas por las interacciones de tipo electrostático. Por lo general los aniones tienen una energía libre de solvatación mayor que los cationes y requieren interacciones más fuertes en agua para competir de manera eficiente con las moléculas de agua que se encuentran sólidamente vinculadas en la esfera de solvatación del anión. Ejemplos de receptores naturales para aniones en agua son la espermidina, la carboxipeptidasa A, y las proteínas que enlazan con fosfatos.

El documento de Frontera A. *et al.*, "Rational design, synthesis, and application of a new receptor for the molecular recognition of tricarboxylate salts in aqueous media". *The Journal of Organic Chemistry*. Sep 2006. ISSN 0022-3263 (Print). Vol. 71. Nr. 19. Pág. 7185 - 7195 describe receptores tripodales destinados al reconocimiento de únicamente sales tricarboxilatos y en medios sólo parcialmente acuosos, en particular se menciona la utilización de un medio H<sub>2</sub>O:EtOH 1:3.

El documento Prohens, R. *et al.* "Squaramido-based receptors: Molecular recognition of carboxylate anions in highly competitive media". *Tetrahedron Letters*. Feb. 1998. ISSN 0040-4039. Vol. 39. Nr. 9. Pág. 1063-1066 describe receptores ditópicos que muestran unos valores de asociación con dicarboxilatos en medio no acuoso aceptables, pero que a medida que se aumenta la cantidad de agua la constante de asociación disminuye drásticamente, es decir, los dicarboxilatos prefieren estar asociados con el agua (solvatados) en lugar de formar un complejo con el receptor.

Hasta la fecha no se ha descrito ningún compuesto tripodal de base escuaramida que sea capaz de interactuar con tricarboxilatos y dicarboxilatos, especialmente en muestras con un medio totalmente acuoso.

Por otro lado, dentro del ámbito biológico los dicarboxilatos son especies importantes debido a que juegan diferentes roles en numerosos procesos metabólicos y en la biosíntesis de importantes intermedios, así como en la generación de enlaces energéticos con fosfatos, y son una pieza estructural clave en la composición de los aminoácidos y pro-

## ES 2 345 809 A1

teínas. De esta forma, el anión glutamato, un aminoácido con dos grupos carboxilatos, es el mayor estimulante del sistema nervioso central.

5 Otro dicarboxilato importante es el folato, que pertenece a la familia de las vitaminas B, con una limitada solubilidad en agua a pH neutro, solo es soluble en agua a pH muy ácido y en disoluciones alcalinas, mostrando una total insolubilidad en disolventes orgánicos. La mayor fuente de folato en la dieta humana procede de las verduras de hoja verde (espinacas, acelgas, etc), guisantes, legumbres, yema de huevo, germen de trigo y levaduras. El ácido fólico es comercialmente muy interesante debido a que una deficiencia en la dieta humana provoca la incorporación masiva de uracilo en el ADN humano (4 millones por célula) rompiendo el cromosoma. Esta ruptura cromosómica provoca un aumento del riesgo de cáncer y lleva agregado defectos cognoscitivos asociados a esta deficiencia de folato en la dieta.

15 Por este motivo, la falta de ácido fólico detectado en la dieta humana a nivel mundial ha llevado a diversos fabricantes, a incorporar ácido fólico a una gran variedad de alimentos y especialmente aquellos que van dirigidos a mujeres embarazadas, niños en edad de crecimiento, y como medida de prevención contra el cáncer a la población en general. Así se encuentran comercializados alimentos enriquecidos con ácido fólico, como cereales, galletas y derivados lácteos. En cosmética el ácido fólico se utiliza en cremas antienvjecimiento. Además, como medida preventiva contra la aparición de bebés con espina bífida es recomendable en estado de gestación por parte de la madre tomar preparados farmacológicos de ácido fólico.

20 Los análogos del folato también son compuestos interesantes, ya que, por ejemplo, el metotrexato es utilizado como antirreumático, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y formas poliartriticas de la artritis idiopática juvenil, así como en el tratamiento de la psoriasis, la artritis psoriásica y la poliartritis.

25 Por tanto, dada la importancia del folato y análogos del mismo es necesario disponer de métodos para su detección y cuantificación con el fin de controlar las cantidades dicho compuesto de una manera rápida y eficaz.

30 En la técnica se conocen métodos tradicionales que utilizan ensayos microbiológicos, o bien, técnicas cromatográficas como TLC o HPLC que requieren el uso de aparatos especializados.

Los ensayos microbiológicos requieren personal experto en el manejo de cultivos de microorganismos y un adecuado control y mantenimiento de estos microorganismos, pero su mayor inconveniente es que estas técnicas son tediosas y se tarda mucho tiempo en obtener una respuesta (24-48 h).

35 Otra alternativa utilizada en la determinación de ácido fólico son los inmunoensayos (test ELISA), que son rápidos (1-3 h) y que no requieren aparatos caros, ni tampoco se precisa de personal altamente especializado. No obstante, entre sus mayores limitaciones se encuentra la notoria variabilidad en los resultados en función del "kit" utilizado. Otra desventaja añadida en esta metodología viene motivada por la rápida caducidad de estos "kits".

40 En la actualidad no hay una metodología de análisis de ácido fólico y análogos del mismo perfecta y que destaque sobremanera, debido a que el ácido fólico es muy sensible al entorno físico en que se encuentra, y que se presenta en varias formas. Aunque hay que resaltar que la técnica de ensayo por microorganismos, es el único método oficial de determinación de folato en alimentos establecido por la AOAC(Method 992.05(2002)) y AACC (ACC Meted 86-47). En esta técnica el microorganismo irás utilizado es *Lactobacillus rhamnosus* que responde a una gran variedad de análogos de folatos. Otros microorganismos utilizados son: *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisae*, *Tetrahymena pyriformis* y *Bacillus coagulans*. Estas determinaciones ofrecen una elevada sensibilidad (nivel de nanogramo) para la mayoría de isómeros del folato. (Trends in Food Science & Technology, 2005, 16, 253-266). Mientras que las técnicas cromatográficas TLC y HPLC, y especialmente esta última, ofrecen una elevada especificidad hacia los diferentes isómeros del folato asociadas a una inequívoca identificación de cada isómero. Se ha comprobado que debido a la limitación de los detectores de HPLC utilizados, en ciertos casos, se ha observado una pérdida de sensibilidad entre el 30 al 40% respecto a los ensayos realizados con microorganismos. A pesar de esto sigue siendo el método por HPLC uno de los métodos más utilizados en la bibliografía.

55 Los procedimientos biológicos de determinación de ácido fólico como el uso de ligandos bio-específicos o bien, inmunoensayos con anticuerpos (ensayo ELISA), son muy sensibles y específicos debido a la fuerte interacción entre anticuerpo/ligando folato. Y son una clara alternativa al método por HPLC y microbiológico especialmente debido a la rapidez de obtención de resultados.

60 Aunque el mayor inconveniente que presentan estos métodos de determinación por procedimientos bioespecíficos es la ausencia de una medida de folato total.

En un esfuerzo exhaustivo de los inventores por encontrar compuestos con características de solubilidad apta para ser utilizados en sistemas quimiosensores que permitan la detección cualitativa y/o cuantitativa de policarboxilatos (dicarboxilatos, tricarboxilatos), preferiblemente folato y análogos del mismo, los inventores de la presente invención han obtenido sorprendentemente y de manera satisfactoria compuestos tripodales de base escuaramida que cumplen o permiten cumplir con los siguientes objetivos mencionados a continuación.

## ES 2 345 809 A1

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto tripodal de base escuaramida con unas características de solubilidad en agua que permiten su utilización en métodos de ensayo con analitos difícilmente solubles en agua.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto tripodal de base escuaramida con un diseño y una rigidez en su esqueleto que permita su interacción con dicarboxilatos.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la obtención de un compuesto tripodal de base escuaramida según las características descritas en los objetivos anteriores.

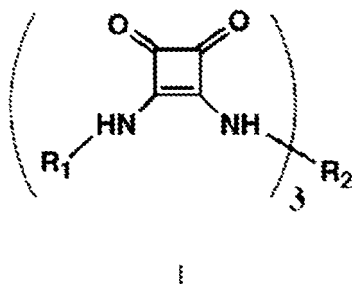
Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema quimiosensor que permita la interacción entre el compuesto tripodal de base escuaramida indicado anteriormente y un indicador de fluorescencia.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que utiliza el sistema quimiosensor mencionado anteriormente para la detección cualitativa y/o cuantitativa de policarboxilatos (dicarboxilatos, tricarboxilatos), preferiblemente folato ara logos del mismo, de una manera rápida, simple, eficaz en muestras comerciales en agua.

20 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un kit que comprenda el sistema quimiosensor indicado anteriormente con el cual pueda llevarse a cabo el procedimiento de detección indicado en el párrafo anterior de una manera cómoda y rápida.

### Descripción resumida de la invención

25 La presente invención se refiere en un primer aspecto a un compuesto tripodal de base escuaramida de fórmula general (I)



40 en la que:

$R_1$  es una sal de amonio alquil  $C_3$ - $C_5$ - $N(CH_3)_3$ ; y

45  $R_2$  se selecciona, independientemente entre sí, de un anillo benceno no sustituido; un anillo benceno trisustituido con radicales, iguales o diferentes entre sí, seleccionados entre metilo o etilo; y una poliamina.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de compuestos de fórmula general (I).

50 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un sistema quimiosensor para la detección cualitativa y/o cuantitativa en muestras acuosas de policarboxilatos seleccionados del grupo que consiste en dicarboxilatos y tricarboxilatos, que comprende:

55 a) un compuesto receptor de fórmula general (I)

y

b) un indicador fluorescente.

60 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección cualitativa y/o cuantitativa de policarboxilatos seleccionados del grupo que consiste en dicarboxilatos y tricarboxilatos, preferiblemente los dicarboxilatos son folato y análogos del mismo.

65 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un kit que contiene el sistema quimiosensor mencionado anteriormente.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1A representa el termograma correspondiente a la valoración del receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio  $C_3-N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el ácido fólico en un sistema agua y tampón (TRIS/HCl) a pH= 9, a 294 K.

La Figura 1B representa la curva que mejor se ajusta a los valores integrados del termograma de la Figura 1A a un modelo de estequiometría 1:1, una vez corregida con la disolución del ácido fólico en un sistema agua y tampón (TRIS/HCl) a pH = 9, a 294 K.

La Figura 2A representa el termograma correspondiente a la valoración del receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio  $C_3-N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el metotrexato en un sistema agua y tampón (TRIS/HCl) a pH = 9, a 294 K.

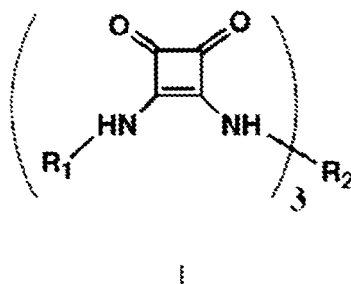
La Figura 2B representa la curva que mejor se ajusta a los valores integrados del termograma de la Figura 2A a un modelo de estequiometría 1:1, una vez corregida con la disolución del ácido fólico en un sistema agua y tampón (TRIS/HCl) a pH= 9, a 294 K.

La figura 3 representa la recta de calibrado a 525 nm obtenida para el sistema formado por el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio  $C_3-N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y la carboxi-fluoresceína a diferentes concentraciones de ácido fólico, en un sistema agua y tampón (TRIS/HCl) a pH = 9, a 294 K. En el interior de la figura se muestran los resultados del ajuste matemático de la recta.

La figura 4 representa la recta de calibrado a 525 nm obtenida para el sistema formado por el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio  $C_3-N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y la carboxi-fluoresceína a diferentes concentraciones de metotrexato, en un sistema agua y tampón (TRIS/HCl) a pH = 9, a 294 K. En el interior de la figura se muestran los resultados del ajuste matemático de la recta.

**Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a un compuesto tripodal de base escuaramida de fórmula general (I)



en la que:

$R_1$  es una sal de amonio alquil  $C_3-C_5-N(CH_3)_3$ ; y

$R_2$  se selecciona, independientemente entre sí, de un anillo benceno no sustituido; un anillo benceno trisustituido con radicales, iguales o diferentes entre sí, seleccionados entre metilo o etilo; y una poliamina.

En una realización preferida,  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$ .

Los compuestos de fórmula general (I) se obtienen a partir de la reacción entre espaciadores de diversa naturaleza, previamente funcionalizados, de mayor o menor flexibilidad molecular, con las escuaramidas de partida. Estas escuaramidas están dotadas de una sal de amonio cuaternario terminal. La reacción de condensación se realiza en condiciones muy suaves y con buen rendimiento (>80%). A modo esquemático, el proceso de síntesis de compuestos de fórmula general (I) comprende las etapas de:

Etapa A

A1) reacción de escuarato de etilo con N,N-dimetil-alquilen- $C_3-C_5$  diamina para obtener un producto (a1) que es N,N-dimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-alquil  $C_3-C_5$  amina;

A2) reacción de (a1) con yoduro de metilo para obtener el yoduro de N,N,N-trimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-alquil  $C_3-C_5$  amonio (a2).

## ES 2 345 809 A1

### Etapa B

B1) reacción de 1,3,5-tris(bromometil)-benceno, donde el benceno puede estar sustituido por radicales iguales o diferentes entre sí seleccionados entre metilo o etilo, con  $\text{NaN}_3$ , para obtener el correspondiente producto (b1) que es 1,3,5-tris(azidometil)-benceno (o el correspondiente benceno sustituido);

B2) hidrogenación catalítica de (b1) para obtener el correspondiente 1,3,5-tris(aminometil)-benceno (o el correspondiente benceno sustituido) (b2).

### 10 Etapa C

C) reacción del producto obtenido (a2) con el producto obtenido (b2) para producir el compuesto de fórmula general (I); o alternativamente, reacción del producto (b2) con (a1) y posterior reacción con  $\text{CH}_3\text{I}$  para producir el compuesto de fórmula general (I);

15 en el que si se desea obtener el compuesto de fórmula general (I) con  $\text{R}_2 =$  poliamina, el producto obtenido (a2) reacciona directamente con tris (2-aminoetil)amina sin pasar por las etapa B y C.

20 Preferiblemente, alquilen  $\text{C}_3\text{-C}_5$  y alquil  $\text{C}_3\text{-C}_5$  corresponden a radicales propileno y propilo, respectivamente.

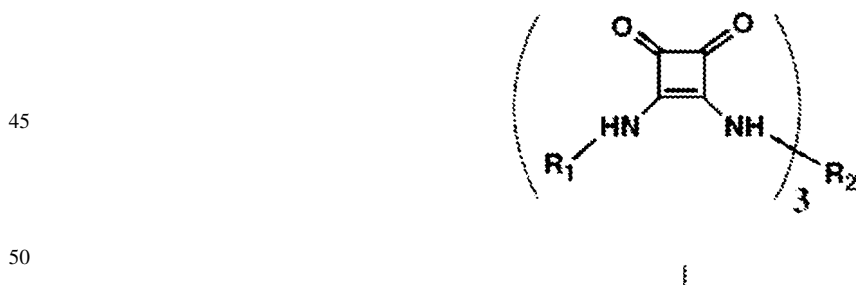
Los productos de partida o reactivos utilizados para las diferentes reacciones se encuentran disponibles comercialmente o son fácilmente obtenibles a partir de procedimientos descritos en la técnica.

25 Cabe indicar que el compuesto de fórmula general (I) se suele obtener en forma de sal (en particular, triyoduro).

Dichos compuestos así obtenidos son tripodales lo que permite la previsible interacción con tricarboxilatos. No obstante, sorprendentemente, la estructura concreta de este compuesto hace que sea útil para la interacción con dicarboxilatos, ya que dos de los brazos de este compuesto forman una asociación de tipo electrostático (como una interacción habitual con dicarboxilato) y el tercer brazo interacciona con la parte hidrofóbica del dicarboxilato, lo cual provoca que aumente la asociación de manera exponencial. Esta característica estructural permite que los compuestos de la presente invención sean altamente solubles en agua a diferentes valores de pH, y hace que sean óptimos para ensayos con analitos que son difícilmente solubles en agua.

35 Debido a estas características, el compuesto tripodal de base escuaramida de fórmula general (I) es útil como receptor en un sistema quimiosensor. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un sistema quimiosensor para la detección cualitativa y/o cuantitativa en muestras acuosas de policarboxilatos seleccionados del grupo que consiste en dicarboxilatos y tricarboxilatos, que comprende:

40 a) un compuesto receptor de fórmula general (I)



en la que:

55  $\text{R}_1$  es una sal de amonio alquil  $\text{C}_3\text{-C}_5\text{-N}(\text{CH}_3)_3$ ; y

$\text{R}_2$  se selecciona, independientemente entre sí, de un anillo benceno no sustituido; un anillo benceno trisustituido con radicales, iguales o diferentes entre sí, seleccionados entre metilo o etilo; y una poliamina;

60 y

b) un indicador fluorescente.

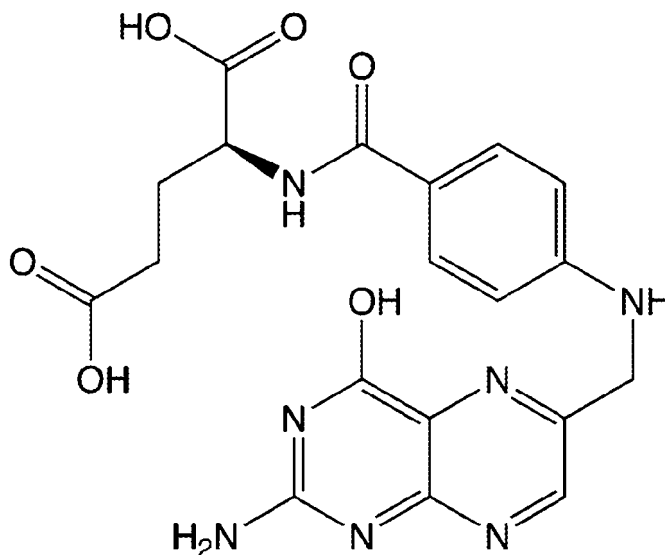
65 En una realización preferida,  $\text{R}_1$  es una sal de amonio propil- $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ .

En una realización preferida, el indicador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en fluoresceínas, Eritrosina, Eosina, Rosa de Bengala y Floxina.

## ES 2 345 809 A1

En otra realización preferida, los dicarboxilatos a detectar son folato y análogos del mismo.

Por "folato" se entiende el anión del ácido fólico o ácido pteroilglutámico (PGA) que es una molécula compleja formada por un resto bicíclico de pterina enlazado por un grupo metilénico al ácido paraaminobenzoico (pABA) que a su vez y través de un enlace peptídico se une a una molécula de ácido L-glutámico. El resto de pteridina puede existir tanto en forma oxidada como reducida. La carga del ácido fólico, menos dos, un dicarboxilato, se encuentra en el resto del ácido L-glutámico.



Ácido fólico

Cuando se hace referencia a "análogos de folato" en la presente invención se entiende que se refiere a compuestos seleccionados del grupo que consiste en:

- ácido N-[4-[2-(2-amino-4-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)etil]benzoil]-L-Glutámico Número Registro CAS: [306314-88-5].

- ácido N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [54-62-6];

- ácido N-[4-[[2-amino-3,4-dihidro-4-oxo-6-quinazolil]metil]-2-propin-1-ilamino]benzil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [76849-19-9];

- ácido N-[4-[[1,4-dihidro-2-metil-4-oxo-6-quinazolil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [112887-79-3];

- ácido (2S)-[[4-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]benzoil]amino]-4-sulfo-L-Glutámico. Número Registro CAS: [139347-01-6];

- ácido (2S)-[5-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]-1,3-dihidro-1-oxo-2H-isoindol-2-il]-pentanodioico. Número Registro CAS: [246545-24-4];

- ácido N-[4-[[2-amino-1,4,5,6-tetrahidro-5-metil-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: 28581-42-2;

- ácido N-[4-(3-amino-1,2,5,6,6a,7-hexahidro-1-oxoimidazo[1,5-f]pteridin-8(9H)-il)benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [3432-99-3];

- ácido N-[4-[[2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]formilamino]benzoil]-L-Glutámico Número Registro CAS: [2800-34-2];

- dihidrógeno fosfato de N-[4-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]benzoil]-L-homoserina. Número Registro CAS: [866772-91-0];

- ácido N-[[5-[2-[(6R)-2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]etil]-2-tienil]carbonil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [127228-54-0];

## ES 2 345 809 A1

- sal cálcica (1:1) del ácido, N-[4-[[2-amino-5-formil-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [1492-18-8];

5 - ácido N-[4-[2-[(6R)-2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]etil]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [106400-81-1];

- 3-amino-8-[4-[[[(1S)-1,3-dicarboxipropil]amino]carbonil]fenil]-1,2,5,6,(6aR),7-hexahidro-1-oxo-imidazo[1,5-f]pteridinio. Número Registro CAS: [10360-12-0];

10 - ácido N-[4-[[2-amino-3,4-dihidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]metilamino]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [2410-93-7];

- ácido, N-[4-[[2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [135-16-0];

15 - ácido N-[4-[[1,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-6-il]metil]metilamino]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [148315-60-0];

20 - ácido (2S)-[[4-[[2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]benzoil]amino]-4-sulfo-butanoico. Número Registro CAS: [866772-95-4];

- ácido N-[4-[[2-amino-3,4,7,8-tetrahidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [4033-2 7-6];

25 - ácido N-[4-[[2-amino-3,4-dihidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L- $\gamma$ -glutamil-L-glutámico. Número Registro CAS: [19360-00-0];

- ácido 2-[[4-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]benzoil]amino]-4-fosfono-butanoico. Número Registro CAS: [170470-98-1];

30 - ácido N-[4-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-quinazolinil)etil]benzoil]-L-Glutámico. Número Registro CAS: [132014-31-4];

- ácido N-(4-aminobenzoil)-L-Glutámico. Número Registro CAS: [4271-30-1];

35 - Metotrexato;

- Pemetrexed; y

40 - Raltitrexed.

Preferiblemente, los “análogos de folato” son Metotrexato, Pemetrexed o Raltitrexed.

En la presente invención, por “policarboxilato” se entiende estrictamente “dicarboxilatos” y “tricarboxilatos”.

45 La presente invención también se refiere a un procedimiento para la detección de policarboxilatos seleccionados del grupo que consiste en dicarboxilatos y tricarboxilatos, que comprende las etapas de:

50 a) disolución de la muestra en una solución tamponada a pH 9 que contiene el sistema quimiosensor de la presente invención con todas sus realizaciones;

b) observación de la fluorescencia después de por lo menos una hora.

55 En una realización particular, si dicha muestra es sólida, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de pretratamiento de la muestra que consiste en la solubilización de la muestra sólida en una disolución tamponada a pH 9 por irradiación con ultrasonidos durante por lo menos 15 minutos, centrifugación y obtención de un líquido sobrenadante que se utilizará en dicha etapa a).

En otra realización particular, la detección es cuantitativa y comprende adicionalmente las siguientes etapas:

60 c) medición de la fluorescencia observada;

d) correlación entre dicha fluorescencia observada y la concentración de dichos policarboxilatos en el analito.

65 En una realización preferida, los dicarboxilatos a detectar son folato y análogos del mismo, tal y como se han definido anteriormente.



## ES 2 345 809 A1

La presente invención también se refiere a un kit que comprende el sistema quimiosensor descrito anteriormente en la presente invención y el tampón en un envase adecuado. El kit contiene preferiblemente las instrucciones para el uso del sistema quimiosensor para la detección de policarboxilatos (dicarboxilatos, tricarboxilatos).

- 5 A continuación, se indican los siguientes ejemplos con propósitos únicamente ilustrativos, y no se pretende de ningún modo limitar el ámbito de la presente invención.

### Ejemplos

- 10 Síntesis del receptor en el que:

R<sub>1</sub> es una sal de amonio propil-NR<sub>3</sub>, en el que R es metilo; y

R<sub>2</sub> es un anillo de benceno no sustituido

15

#### *Síntesis de la N,N-dimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamina*

- En un matraz de fondo redondo de 100 mL, se introduce una disolución de 2 g (11,8 mmol) de escuarato de dietilo en 10 mL de éter dietílico anhidro. Sobre ésta, se añade gota a gota, en agitación constante y bajo atmósfera de argón, una disolución de 1 g de la N,N-dimetilpropilendiamina (9,8 mmol) en 10 mL de éter dietílico anhidro. La mezcla se deja en agitación bajo atmósfera inerte durante 12 horas. Pasado este tiempo, se observa la aparición de un precipitado. Se añaden 20 mL de pentano y se enfría en un baño de agua-hielo, provocando la precipitación del producto deseado. Se centrifuga y se retira el líquido por decantación. El sólido resultante se lava tres veces con 10 mL de pentano y unas gotas de éter dietílico. Se obtienen 2,21 g (9,78 mmol, 98%) de N,N-dimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamina como un sólido blanco que se seca al aire.

25

#### *Síntesis del yoduro de N,N,N-trimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamonio*

- En un matraz de fondo redondo de 250 mL se disuelven 2,17 g (9,6 mmol) de la N,N-dimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamina en 60 mL de acetona. Con la ayuda de una jeringa, se introducen en la disolución 910 µl (14,6 mmol) de yoduro de metilo. La mezcla de reacción se deja a reflujo en atmósfera de argón durante 12 horas. Después de este tiempo, el crudo se enfría a temperatura ambiente, se añaden 30 mL de pentano y se coloca en un baño de agua-hielo. De esta forma se consigue la precipitación de un polvo amarillo, que se recupera por decantación y se lava 3 veces con 30 mL de pentano y unas gotas de acetona. Se seca al aire, obteniéndose 3,5 g (9,51 mmol, 99%) del yoduro de N,N,N-trimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamonio.

35

#### *Síntesis del 1,3,5-Tris(bromometil)-benceno*

- Una disolución que contiene 6 g (0,05 mol) de mesitileno, 27,5 g (0,15 mol) de N-bromosuccinimida (NBS), 0,27 g de peróxido de benzoilo, y 150 mL de benceno se calienta a reflujo para iniciar la reacción. La reacción es tan exotérmica que incluso se mantiene el reflujo sin necesidad de calentar. Posteriormente se calienta de nuevo a reflujo durante 1 hora irás para completar la reacción. Se filtra el sólido, y el filtrado se lava con agua y se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se elimina el benceno a presión reducida obteniéndose un sólido cristalino en forma de finas agujas. La recrystalización del crudo se lleva a cabo en una mezcla de etanol y hexano (1:1 en volumen). Obteniéndose 16,2 g (0,046 mol, 92%) de 1,3,5-Tris(bromometil)-benceno puro.

45

#### *Síntesis del 1,3,5-Tris(azidometil)-benceno*

- En un matraz de fondo redondo se disuelven 1 g (2,82 mmol) de 1,3,5-tris(bromometil)-benceno en 30 ml de acetona anhidra. A continuación se añaden 1,48 g (22,77 mmol) de azida sódica. La mezcla se refluje durante 8 horas, y se deja en agitación a temperatura ambiente 12 horas irás. Transcurrido este tiempo se filtra el sólido sobre celita. El disolvente se elimina a presión reducida. El sólido obtenido se disuelve en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lava con 3 x 15 mL de agua. Se seca con sulfato sódico anhidro. Y el disolvente se destila a presión reducida. El producto obtenido, 0,68 g (2,80 mmol, 99%) de 1,3,5-tris(azidometil)-benceno es un aceite amarillo pálido.

55

#### *Síntesis del 1, 3, 5-Tris(aminometil)-benceno*

- Se disuelven 1,38 g (5,68 mmol) de tris(azidometil)-benceno en 40 mL de etanol absoluto en un matraz de hidrogenación. A esta disolución se añaden 170 mg de Pd/C al 10% en peso a la mezcla. La mezcla se hidrogena, a temperatura ambiente, durante 4 horas a 30 mm de Hg de presión. El Pd/C se filtra sobre celita y el filtrado se destila a presión reducida obteniéndose 0,63 g (3,82 mmol, 67%) de 1,3,5-tris(aminometil)-benceno como un aceite amarillo pálido que no necesita posterior purificación.

60

#### *Síntesis del triyoduro de 1,3,5-Tris[metil-[3-N',N',N'-trimetilamonio]propilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-benceno*

65

- En un matraz de fondo redondo se disuelven 368 mg (1 mmol) del yoduro de N,N,N-trimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamonio, en 20 ml de metanol absoluto. A esta disolución, en agitación constante y a temperatura ambiente, se le añaden, gota a gota, 54,4 mg (0,33 mmol) de 1,3,5-tris(aminometil)-benceno disueltos en 30 ml de

## ES 2 345 809 A1

metanol absoluto. La adición se realiza en atmósfera inerte (Argón). Una vez acabada se deja a temperatura ambiente en agitación durante 15 h. Transcurrido este tiempo, se observa la formación de un precipitado blanco esponjoso. Se le añade 15 mL de pentano y se deja en un baño de agua-hielo. El precipitado se recupera por centrifugación. El sólido se lava tres veces con 10 ml de éter dietílico y unas gotas de pentano. Se seca al vacío una hora, obteniéndose de esta forma 280 mg (0,25 mmol, 75%) el triyoduro de 1,3,5-tris[metil-[3-*N',N',N'*-trimetilamoniopropilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-benceno, como un sólido blanco.

Síntesis del receptor en el que:

$R_1$  es una sal de amonio propil-NR<sub>3</sub>, en el que R es metilo; y

$R_2$  es un anillo benceno trisustituido con metilos

### *Síntesis del 1,3,5-Tris(azidometil)-2,4,6-trimetilbenceno*

En un matraz de fondo redondo se disuelven 2 g (4,6 mmol) de 1,3,5-Tris(bromometil)-2,4,6-trimetilbenceno en 50 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF). A continuación se añaden 2 g (30,8 mmol) de azida sódica. La mezcla se calienta a 80°C durante 8 horas, y se deja posteriormente en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas más. Transcurrido este tiempo se añaden 40 ml de éter dietílico, para provocar la precipitación del BrNa. El precipitado se filtra sobre celita. El filtrado se lava con 5 x 40 mL de agua. Este se seca con sulfato sódico anhidro. Y el disolvente se destila a presión reducida. El producto sólido obtenido se recrystaliza de acetato de etilo y hexano, obteniéndose 1,44 g (4,43 mmol, 97%) de 1,3,5-tris(azidometil)-2,4,6-trimetilbenceno.

### *Síntesis del 1,3,5-Tris(aminometil)-2,4,6-trimetilbenceno*

Se disuelven 286 mg (1 mmol) de tris(azidometil)-2,4,6-trimetilbenceno en 25 mL de etanol absoluto en un matraz de hidrogenación. Se añaden 30 mg de Pd/C al 10% en peso a la disolución. La mezcla se hidrogena, a temperatura ambiente durante 4 horas a 30 mm de Hg de presión. El Pd/C se filtra sobre celita y el filtrado se destila a presión reducida, obteniéndose 207 mg (1,73 mmol, 100%) de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trimetilbenceno como un sólido amarillo pálido que no necesita posterior purificación.

### *Síntesis del triyoduro de 1,3,5-Tris[metil-[3-*N',N',N'*-trimetilamoniopropilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-2,4,6-trimetilbenceno*

En un matraz de fondo redondo se disuelven 368 mg (1 mmol) del yoduro de *N,N,N*-trimetil-*N'*-(2-etoxi-3, 4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamónio, en 20 ml de etanol. A esta disolución, en agitación constante y a temperatura ambiente, se le añaden, gota a gota, 69 mg (0,33 mmol) de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trimetilbenceno disueltos en 20 ml de etanol. La adición se realiza en atmósfera inerte (Argón). Una vez acabada se deja a temperatura ambiente en agitación durante 15 h. Pasado este tiempo, se observa la formación de un precipitado blanco que se recupera por centrifugación. El sólido se lava dos veces con 10 mL de etanol frío y después dos veces irás con 10 mL de éter dietílico, se seca al vacío durante 1 h, obteniéndose de esta manera 297 mg (0,254 mmol, 76%) del triyoduro de 1,3,5-tris[metil-[3-*N',N',N'*-trimetilamoniopropilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-2,4,6-trimetilbenceno como un sólido marrón pálido.

Síntesis del receptor en el que:

$R_1$  es una sal de amonio propil-NR<sub>3</sub>, en el que R es metilo; y

$R_2$  es un anillo benceno trisustituido con etilos.

### *Síntesis del 1,3,5-Tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno*

Se añade lentamente a temperatura ambiente, 19,9 g (87,5 mmol) de bromuro de zinc a una mezcla de paraformaldehído (16,7 g, 556,3 mmol) y trietilbenceno (10 mL, 53,1 mmol) en 100 mL de HBr/AcOH (30% en peso). La mezcla se calienta a reflujo a 90°C durante 17 horas, observándose durante este tiempo la formación de cristales blancos. El crudo de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente, separándose el sólido formado por filtración. El sólido se lava con agua, y se seca al vacío durante una noche. De esta forma se obtiene 22,79 g (51,7 mmol, 97%) de 1,3,5-Tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno como un sólido blanco.

### *Síntesis del 1,3,5-Tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno*

En un matraz de fondo redondo se disuelven 0,2 g (0,45 mmol) de 1,3,5-Tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno en 12 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF). A continuación se añaden 0,2 g (3,08 mmol) de azida sódica. La mezcla se calienta a 80°C durante 8 horas, y se deja en agitación a temperatura ambiente 12 horas más. Transcurrido este tiempo se añaden 20 ml de éter dietílico, para provocar la precipitación del BrNa. El crudo se filtra sobre celita. El filtrado se lava con 5 x 40 mL de agua. Se seca con sulfato sódico anhidro. Y el disolvente se destila a presión reducida. El producto obtenido se recrystaliza de acetato de etilo y hexano, obteniéndose 0,14 g, (0,43 mmol, 94,3%) de 1,3,5-tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno.

## ES 2 345 809 A1

### *Síntesis del 1,3,5-Tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno*

Se disuelven 605 mg (1,8 mmol) de tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno en 35 mL de etanol absoluto en un matraz de hidrogenación. Añadiéndose 61 mg de Pd/C al 10% en peso a la mezcla. La mezcla se hidrogena durante 4 horas a 30 mm de Hg de presión. El Pd/C se filtra sobre celita y el filtrado se destila a presión reducida obteniéndose 430 mg (1,73 mmol, 95%) de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno como un sólido amarillo pálido que no necesita posterior purificación.

### *Síntesis del 1,3,5-Tris-[(3-aminometil)-4-(2-N,N-dimetilaminopropilamino)-3-ciclobuteno-1,2-diona]-2,4,6-trietilbenceno*

En un matraz de fondo redondo se disuelven 0.66 g (2.9 mmol) de *N,N*-dimetil-*N'*-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamina, en 20 ml de etanol. A esta disolución, en agitación constante, se le añaden gota a gota 0,22 g (0.89 mmol) de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno disueltos en 20 ml de etanol. La adición se realiza en atmósfera inerte (Argón). Una vez acabada se deja a temperatura ambiente en agitación durante 15 h. Pasado este tiempo, se observa la formación de un precipitado, que se recupera por filtración. El sólido se lava con etanol frío 2 x 10 ml y se seca al vacío durante una hora, obteniéndose de esta manera 0.44 g (0,56 mmol, 66%) de 1,3,5-tris-[(3-aminometil)-4-(2-*N,N*-dimetilaminopropilamino)-3-ciclobuteno-1,2-diona]-2,4,6-trietilbenceno como un sólido blanco.

### *Síntesis del triyoduro de 1,3,5-Tris[metil-[3-*N',N',N'*-trimetilamoniopropilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-2,4,6-trietilbenceno*

En un matraz de fondo redondo se disuelven a temperatura ambiente, 758 mg (0,96 mmol) de 1,3,5-tris-[(3-aminometil)-4-(2-*N,N*-dimetilaminopropilamino)-3-ciclobuteno-1,2-diona]-2,4,6-trietilbenceno en 40 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF). A continuación se añaden 60 mL de acetona. Con la ayuda de una microjeringa se añaden 162 microlitros (2,6 mmol) de yoduro de Metilo. La disolución se mantiene a reflujo durante 8 h en atmósfera de argón. Observándose que medida que se calienta la mezcla el sólido se va disolviendo. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se enfría el matraz en un baño de agua-hielo para provocar la precipitación del sólido. El sólido se aísla por centrifugación, y se lava dos veces con 10 mL de acetona, y se seca al vacío durante 1 hora, obteniéndose de esta forma 456 mg (0,37 mmol, 39%) del triyoduro de 1,3,5-tris[metil-[3-*N',N',N'*-trimetilamoniopropilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-2,4,6-trietilbenceno como un sólido blanco.

Síntesis del receptor en el que:

R<sub>1</sub> es una sal de amonio propil-NR<sub>3</sub>, en el que R es metilo; y

R<sub>2</sub> es una poliamina.

### *Síntesis del triyoduro de N,N,N-Tris[[3-*N',N',N'*-trimetilamoniopropilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-tris (2-aminoetil)amina*

En un matraz de fondo redondo se disuelven 368 mg (1 mmol) del yoduro de *N,N,N*-trimetil-*N'*-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-propilamonio, en 20 ml de metanol. A esta disolución, en agitación constante y a temperatura ambiente, se le añaden, gota a gota, 45,3 mg (0,33 mmol) de tris(2-aminoetil)amina (tren) disueltos en 15 ml de metanol, en atmósfera de argón. A continuación, se deja en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Pasado este tiempo, se observa la formación de un precipitado blanco. Se elimina el disolvente a presión reducida. El sólido se lava tres veces con 10 mL de éter dietílico, se seca al vacío, obteniéndose de esta manera 282 mg (0,253 mmol, 82%) de triyoduro de *N,N,N*-tris[[3-*N',N',N'*-trimetilamoniopropilamino]-3,4-dioxo-1-ciclobutenil]-tris(2-aminoetil)amina.

### *1.- Obtención de isotermas de asociación por calorimetría ITC*

#### *Para folato*

Las isotermas se han obtenido con un microcalorímetro isoterma (ITC) de la marca Microcal Inc., por valoración directa entre el receptor de fórmula (I) en donde R<sub>1</sub> es una sal de amonio C<sub>3</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y R<sub>2</sub> es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el folato (es decir, adicionando el folato sobre el receptor y no a la inversa), a una temperatura estabilizada de 21°C. Tanto el receptor como el sustrato se encuentran disueltos en agua que contiene un 25% de tampón 1M de TRIS:HC1 (pH =9), en una concentración aproximadamente de 2,06x10<sup>-3</sup> M de receptor y 18,24x10<sup>-3</sup> M de sustrato.

Para ello se adicionan un total de 250 microlitros de disolución de sustrato a 1,8 ml de disolución de receptor, en alícuotas de 6 microlitros cada una. Los datos obtenidos de esta forma se ajustan mediante el modelo de interacción 1:1 del programa Microcal Origin (Delta H). Con este ajuste se obtienen los valores de la constante de asociación del proceso, K<sub>a</sub>, el valor de la entalpia de reacción, ΔH, y de la entropía, ΔS, así como la confirmación de la estequiometría de la complejación, el parámetro n que se muestran en la Tabla 1. Que corresponden a las Figuras 1A y 1B.

## ES 2 345 809 A1

### *Para metotrexato*

Las isotermas (correspondientes a las figuras 2A y 2B) se han obtenido con un microcalorímetro isoterma (ITC) de la marca Microcal Inc., por valoración directa entre el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el metotrexato (es decir, adicionando el metotrexato sobre el receptor y no a la inversa), a una temperatura estabilizada de 21°C. Tanto el receptor como el sustrato se encuentran disueltos en agua que contiene un 25% de tampón 1M de TRIS:HCl (pH =9), en una concentración aproximadamente de  $1,03 \times 10^{-3}$  M de receptor y  $8,76 \times 10^{-3}$  M de sustrato.

Para ello se adicionan un total de 250 microlitros de disolución de sustrato a 1,8 ml de disolución de receptor, en alícuotas de 6 microlitros cada una. Los datos obtenidos de esta forma se ajustan mediante el modelo de interacción 1:1 del programa Microcal Origin (Delta H). Con este ajuste se obtienen los valores de la constante de asociación del proceso,  $K_a$ , el valor de la entalpía de reacción,  $\Delta H$ , y de la entropía,  $\Delta S$ , así como la confirmación de la estequiometría de la complejación, el parámetro n que se muestran en la Tabla 1 más adelante.

### *Para pemetrexed*

Las isotermas (no mostradas) se han obtenido con un microcalorímetro isoterma (ITC) de la marca Microcal Inc., por valoración directa entre el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el pemetrexed (es decir, adicionando el pemetrexed sobre el receptor y no a la inversa), a una temperatura estabilizada de 21°C. Tanto el receptor como el sustrato se encuentran disueltos en agua que contiene un 25% de tampón 1M de TRIS:HCl (pH = 9), en una concentración aproximadamente de  $1,01 \times 10^{-5}$  M de receptor y  $8,85 \times 10^{-3}$  M de sustrato.

Para ello se adicionan un total de 250 microlitros de disolución de sustrato a 1,8 ml de disolución de receptor, en alícuotas de 6 microlitros cada una. Los datos obtenidos de esta forma se ajustan mediante el modelo de interacción 1:1 del programa Microcal Origin (Delta H). Con este ajuste se obtienen los valores de la constante de asociación del proceso,  $K_a$ , el valor de la entalpía de reacción,  $\Delta H$ , y de la entropía,  $\Delta S$ , así como la confirmación de la estequiometría de la complejación, el parámetro n. Se muestran en la Tabla 1 más adelante.

### *Para raltitrexed*

Las isotermas (no mostradas) se han obtenido con un microcalorímetro isoterma (ITC) de la marca Microcal Inc., por valoración directa entre el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el raltitrexed (es decir, adicionando el raltitrexed sobre el receptor y no a la inversa), a una temperatura estabilizada de 21°C. Tanto el receptor como el sustrato se encuentran disueltos en agua que contiene un 25% de tampón 1M de TRIS:HCl (pH = 9), en una concentración aproximadamente de  $1,08 \times 10^{-5}$  M de receptor y  $9,45 \times 10^{-3}$  M de sustrato.

Para ello se adicionan un total de 250 microlitros de disolución de sustrato a 1,8 ml de disolución de receptor, en alícuotas de 6 microlitros cada una. Los datos obtenidos de esta forma se ajustan mediante el modelo de interacción 1:1 del programa Microcal Origin (Delta H). Con este ajuste se obtienen los valores de la constante de asociación del proceso,  $K_a$ , el valor de la entalpía de reacción,  $\Delta H$ , y de la entropía,  $\Delta S$ , así como la confirmación de la estequiometría de la complejación, el parámetro n. Se muestran en la Tabla 1 más adelante.

### *Para citrato*

Las isotermas (no mostradas) se han obtenido con un microcalorímetro isoterma (ITC) de la marca Microcal Inc., por valoración directa entre el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el citrato (es decir, adicionando el citrato sobre el receptor y no a la inversa), a una temperatura estabilizada de 21°C. Tanto el receptor como el sustrato se encuentran disueltos en agua que contiene un 25% de tampón 1M de TRIS:HCl (pH = 9), en una concentración aproximadamente de  $1,91 \times 10^{-3}$  M de receptor y  $1,8 \times 10^{-2}$  M de sustrato.

Para ello se adicionan un total de 250 microlitros de disolución de sustrato a 1,8 ml de disolución de receptor, en alícuotas de 6 microlitros cada una. Los datos obtenidos de esta forma se ajustan mediante el modelo de interacción 1:1 del programa Microcal Origin (Delta H). Con este ajuste se obtienen los valores de la constante de asociación del proceso,  $K_a$ , el valor de la entalpía de reacción,  $\Delta H$ , y de la entropía,  $\Delta S$ , así como la confirmación de la estequiometría de la complejación, el parámetro n. Se muestran en la Tabla 1 más adelante.

### *Para tricarbballato*

Las isotermas (no mostradas) se han obtenido con un microcalorímetro isoterma (ITC) de la marca Microcal Inc., por valoración directa entre el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el tricarbballato (es decir, adicionando el tricarbballato sobre el receptor y no a la inversa), a una temperatura estabilizada de 21°C. Tanto el receptor como el sustrato se encuentran disueltos en agua que contiene un 25% de tampón 1M de TRIS:HCl (pH = 9), en una concentración aproximadamente de  $1,05 \times 10^{-5}$  M de receptor y  $9,45 \times 10^{-3}$  M de sustrato.

## ES 2 345 809 A1

Para ello se adicionan un total de 250 microlitros de disolución de sustrato a 1,8 ml de disolución de receptor, en alícuotas de 6 microlitros cada una. Los datos obtenidos de esta forma se ajustan mediante el modelo de interacción 1:1 del programa Microcal Origin (Delta H). Con este ajuste se obtienen los valores de la constante de asociación del proceso,  $K_a$ , el valor de la entalpía de reacción,  $\Delta H$ , y de la entropía,  $\Delta S$ , así como la confirmación de la estequiometría de la complejación, el parámetro  $n$ . Se muestran en la Tabla 1 más adelante.

### Para trimesoato

Las isotermas (no mostradas) se han obtenido con un microcalorímetro isoterma (ITC) de la marca Microcal Inc., por valoración directa entre el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$  y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y el trimesoato (es decir, adicionando el trimesoato sobre el receptor y no a la inversa), a una temperatura estabilizada de 21°C. Tanto el receptor como el sustrato se encuentran disueltos en agua que contiene un 25% de tampón 1M de TRIS:HCl (pH = 9), en una concentración aproximadamente de  $1,14 \times 10^{-3}$  M de receptor y  $9,84 \times 10^{-3}$  M de sustrato.

Para ello se adicionan un total de 250 microlitros de disolución de sustrato a 1,8 ml de disolución de receptor, en alícuotas de 6 microlitros cada una. Los datos obtenidos de esta forma se ajustan mediante el modelo de interacción 1:1 del programa Microcal Origin (Delta H). Con este ajuste se obtienen los valores de la constante de asociación del proceso, el valor de la entalpía de reacción,  $\Delta H$ , y de la entropía,  $\Delta S$ , así como la confirmación de la estequiometría de la complejación, el parámetro  $n$ . Se muestran en la Tabla 1 más adelante.

TABLA 1

*Constantes de asociación ( $K_{asoc}$ ,  $M^{-1}$ ), Energía libre de asociación de Gibbs ( $-G$ , kJ/mol), entalpía de asociación ( $-H$ , kJ/mol), entropía de asociación ( $T \cdot S$ , kJ/mol) para varios policarboxilatos con un receptor escuaramídico en  $H_2O$  a pH = 9,0 en una disolución tamponada 1 M TRIS-HCl, a 294 K*

Policarboxilato	$K_{asoc}$	$\Delta G$	$\Delta H$	$T \Delta S$	$n$
Folato	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$	-23,9	-31,3	-7,4	0,9
Metotrexato	$(4,5 \pm 0,1) \times 10^4$	-26,1	-27,6	-1,5	1,0
Pemetrexed	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^3$	-21,7	-6,4	-15,3	1,0
Raltitrexed	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$	-24,2	-33,7	-9,5	1,1
Citrato	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^4$	-25,0	-18,3	6,7	1,0
Tricarballato	$(2,7 \pm 0,07) \times 10^4$	-24,9	-2,7	22,2	0,9
Trimesoato	$(2,5 \pm 0,07) \times 10^4$	-24,6	-22,4	2,2	0,9

### 2.- Obtención de la concentración de folato en una muestra de acfol®

Para realizar esta determinación se preparan tres disoluciones "madre", la primera con 4(5)-carboxifluoresceína, la segunda con el receptor de fórmula (I) en donde  $R_1$  es una sal de amonio propil- $N(CH_3)_3$ , y  $R_2$  es un anillo de benceno trisustituido con etilos y finalmente otra con el folato. Las tres disoluciones se preparan con agua purificada con un 25% de tampón HCl/TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) 1M de pH = 9. La disolución que contiene la carboxifluoresceína es  $2,88 \times 10^{-5}$  M. La disolución que contiene el receptor es  $6,26 \times 10^{-4}$  M y la disolución que contiene el folato es de 444 ppm. A partir de estas disoluciones madre se preparan otras cuatro disoluciones de la siguiente manera:

Se mezclan 3 ml de la disolución de carboxifluoresceína con 1 ml de agua purificada 25% tampón, obteniendo una concentración final de  $2,16 \times 10^{-5}$  M. Esta disolución se utiliza para calibrar la intensidad de emisión irrima de fluorescencia, que se calibra a 7,2 unidades de fluorescencia.

Se prepara una segunda disolución a partir de 3 ml de disolución de carboxifluoresceína con 0,5 ml de disolución de receptor y 0,5 ml de agua con 25% de tampón, obteniendo concentraciones finales de  $2,16 \times 10^{-5}$  M de carboxifluoresceína y de  $6,26 \times 10^{-5}$  M de receptor.

La tercera disolución se prepara a partir de 3 ml de disolución de carboxifluoresceína, 0,5 ml de disolución de receptor y 0,5 ml de disolución del folato, obteniendo concentraciones finales  $2,16 \times 10^{-5}$  M de carboxifluoresceína,  $6,26 \times 10^{-5}$  M de receptor y 55,5 ppm de folato.

## ES 2 345 809 A1

Finalmente, la cuarta disolución se prepara a partir de 3 ml de disolución de carboxifluoresceína, 0,5 ml de disolución de receptor y 0,5 ml de disolución de muestra desconocida, obteniendo concentraciones finales de  $2,16 \times 10^{-5}$  M de carboxifluoresceína y de  $6,26 \times 10^{-5}$  M de receptor.

5 Para preparar la disolución de la muestra comercial (acfol<sup>®</sup>) se procede de la siguiente manera:

Se suspende una pastilla que contiene 5 mg de ácido fólico (acfol<sup>®</sup>) en 25 ml de una mezcla de agua purificada con un 25% de tampón TRIS/HCl 1M. Tratando la suspensión en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. La suspensión resultante se centrifuga a 7.000 rpm/min durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se trasvasa a un  
10 matraz aforado de 25 ml enrasando con agua Millipore con un 25% de tampón TRIS/HCl 1M.

Las disoluciones anteriores así preparadas se dejan envejecer un mínimo de 2 horas. Finalizado este tiempo se mide la fluorescencia observada, longitud de onda de excitación 450 nm, longitud de onda de emisión 525 nm.

15 Para obtener la recta de calibrado se valora la disolución que contiene solo la 4(5)-carboxifluoresceína y el receptor con la disolución que contiene la 4(5)-carboxifluoresceína y el receptor, y el folato. La lectura de cada punto se realiza tres veces, (véase la Figura 3).

La obtención de la concentración de la muestra desconocida se obtiene a partir de la lectura de la intensidad de la  
20 cuarta disolución, que contiene la 4(5)-carboxifluoresceína, receptor y muestra desconocida, calculándola a partir de la recta de calibrado (Figura 3) la concentración de folato en ppm. El valor obtenido, 4,6 mg, es la media aritmética de tres medidas independientes siendo el error relativo de un 8%.

25 3.- *Obtención de la concentración de metotrexato en una muestra de metoject<sup>®</sup>*

Para realizar esta determinación se preparan tres disoluciones “madre”, la primera con 4(5)-carboxifluoresceína, la segunda con el receptor de fórmula (I) en donde R<sub>1</sub> es una sal de amonio propil-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y R<sub>2</sub> es un anillo de benceno trisustituido con etilos y finalmente otra con el metotrexato. Las tres disoluciones se preparan con agua purificada con un 25% de tampón HCl/TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) 1M de pH = 9. La disolución que contiene la carboxifluoresceína es  $2,72 \times 10^{-5}$  M. La disolución que contiene el receptor es  $5,13 \times 10^{-4}$  M y la disolución que contiene el metotrexato es de 438 ppm. A partir de estas disoluciones madre se preparan otras cuatro disoluciones de la siguiente manera:

35 Se mezclan 3 ml de la disolución de carboxifluoresceína con 1 ml de agua purificada 25% tampón, concentración final  $2,05 \times 10^{-5}$  M. Esta disolución se utiliza para calibrar la intensidad de emisión máxima de fluorescencia, que se calibra a 7,2 unidades de fluorescencia.

Se prepara una segunda disolución a partir de 3 ml de disolución de carboxifluoresceína con 0,5 ml de disolución de receptor y 0,5 ml de agua con 25% de tampón, obteniendo concentraciones finales  $2,05 \times 10^{-5}$  M de carboxifluoresceína y  $6,42 \times 10^{-5}$  M de receptor.

La tercera disolución se prepara a partir de 3 ml de disolución de carboxifluoresceína, 0,5 ml de disolución de receptor y 0,5 ml de disolución del metotrexato, obteniendo concentraciones finales de  $2,05 \times 10^{-5}$  M de carboxifluoresceína,  $6,42 \times 10^{-5}$  M de receptor y 54,7 ppm de metotrexato.

45 Finalmente, la cuarta disolución se prepara a partir de 3 ml de disolución de carboxifluoresceína, 0,5 ml de disolución de receptor y 0,5 ml de disolución de muestra desconocida, obteniendo concentraciones finales de  $2,05 \times 10^{-5}$  M de carboxifluoresceína y  $6,42 \times 10^{-5}$  M de receptor.

50 Para preparar la disolución de la muestra comercial (metoject<sup>®</sup>) se procede de la siguiente manera:

Se diluyen en un matraz aforado 120 microlitros (1,2 mg) de la muestra en 10 ml de agua purificada con un 25% de tampón TRIS/HCl 1M.

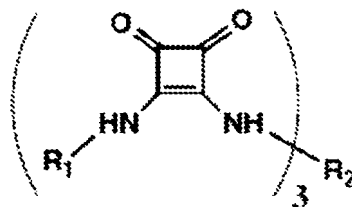
55 Las disoluciones anteriores así preparadas se dejan envejecer un mínimo de 2 horas. Finalizado este tiempo se mide la fluorescencia observada, longitud de onda de excitación 450 nm, longitud de onda de emisión 525 nm.

60 Para obtener la recta de calibrado se valora la disolución que contiene sólo la 4(5)-carboxifluoresceína y el receptor con la disolución que contienen la 4(5)-carboxifluoresceína y el receptor, y el metotrexato. La lectura de cada punto se realiza tres veces. (Véase la Figura 4).

La obtención de la concentración de la muestra desconocida se obtiene a partir de la lectura de la intensidad de la cuarta disolución, que contiene la 4(5)-carboxifluoresceína, receptor y muestra desconocida, calculándola a partir de la recta de calibrado (Figura 4) la concentración de metotrexato en ppm. El valor obtenido, 1,37 mg, es la media aritmética de tres medidas independientes siendo el error relativo de un 12%.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto tripodal de base escuaramida de fórmula general (I)



I

en la que:

R<sub>1</sub> es una sal de amonio alquil C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; y

R<sub>2</sub> se selecciona, independientemente entre sí, de un anillo benceno no sustituido; un anillo benceno trisustituido con radicales, iguales o diferentes entre sí, seleccionados entre metilo o etilo; y una poliamina.

2. Compuesto tripodal de base escuaramida según la reivindicación 1, en el que R<sub>1</sub> es una sal de amonio propil-NR<sub>3</sub>.

3. Procedimiento para la obtención del compuesto según la reivindicación 1 ó 2 que comprende las etapas de:

Etapa A

A1) reacción de escuarato de etilo con N,N-dimetil-alquilen-C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> diamina para obtener un producto (a1) que es N,N-dimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-alquil C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> amina;

A2) reacción de (a1) con yoduro de metilo para obtener el yoduro de N,N,N-trimetil-N'-(2-etoxi-3,4-dioxo-1-ciclobutenil)-alquil C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> amonio (a2).

Etapa B

B1) reacción de 1,3,5-tris(bromometil)-benceno, donde el benceno puede estar sustituido por radicales iguales o diferentes entre sí seleccionados entre metilo o etilo, con NaN<sub>3</sub> para obtener el correspondiente producto (b1) que es 1,3,5-tris(azidometil)-benceno (o el correspondiente benceno sustituido);

B2) hidrogenación catalítica de (b1) para obtener el correspondiente 1,3,5-tris(aminometil)-benceno (o el correspondiente benceno sustituido) (b2).

Etapa C

C) reacción del producto obtenido (a2) con el producto obtenido (b2) para producir el compuesto de fórmula general (I); o alternativamente, reacción del producto (b2) con (a1) y posterior reacción con CH<sub>3</sub>I para producir el compuesto de fórmula general (I);

en el que si se desea obtener el compuesto de fórmula general (I) con R<sub>2</sub> = poliamina, el producto obtenido (a2) reacciona directamente con tris(2-aminoetil)amina sin pasar por las etapas B y C.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que alquilen C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> y alquil C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> corresponden a radicales propileno y propilo, respectivamente.

5. Sistema quimiosensor para la detección cualitativa y/o cuantitativa en muestras acuosas de policarboxilatos seleccionados del grupo que consiste en dicarboxilatos y tricarboxilatos, que comprende:

a) un compuesto receptor según la reivindicación 1 ó 2;

y

b) un indicador fluorescente.

## ES 2 345 809 A1

6. Sistema quimiosensor según la reivindicación 5 en el que el indicador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en fluoresceínas, Eritrosina, Eosina, Rosa de Bengala y Floxina.

7. Procedimiento para la detección de policarboxilatos seleccionados del grupo que consiste en dicarboxilatos y tricarboxilatos, que comprende las etapas de:

a) disolución de la muestra en una solución tamponada a pH 9 que contiene el sistema quimiosensor según la reivindicación 5 ó 6;

b) observación de la fluorescencia después de por lo menos una hora.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 en el que dicha muestra es sólida, que comprende adicionalmente una etapa de pretratamiento de la muestra que consiste en la solubilización de la muestra sólida en una disolución tamponada a pH 9 por irradiación con ultrasonidos durante por lo menos 15 minutos, centrifugación y obtención de un líquido sobrenadante que se utilizará en dicha etapa a).

9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que dicha detección es cuantitativa y comprende adicionalmente las siguientes etapas:

c) medición de la fluorescencia observada;

d) correlación entre dicha fluorescencia observada y la concentración de dichos policarboxilatos en el analito.

10. Kit que comprende el sistema quimiosensor según las reivindicaciones 5 ó 6.

11. Sistema quimiosensor según las reivindicaciones 5 ó 6, procedimiento según las reivindicaciones 7 a 9 o kit según la reivindicación 10, en los que los dicarboxilatos son folato o ara logos del mismo seleccionados del grupo que consiste en:

- ácido N-[4-[2-(2-amino-4-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)etil]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-[[2,4-diamino-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-[[2-amino-3,4-dihidro-4-oxo-6-quinazolini]metil]-2-propin-1-ilamino]benzil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-[[1,4-dihidro-2-metil-4-oxo-6-quinazolini]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido (2S)-[[4-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]benzoil]amino]-4-sulfo-L-Glutámico;

- ácido (2S)-[5-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]-1,3-dihidro-1-oxo-2H-isoindol-2-il]-pentanodioico;

- ácido N-[4-[[2-amino-1,4,5,6-tetrahidro-5-metil-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-(3-amino-1,2,5,6,6a,7-hexahidro-1-oxoimidazo[1,5-f]pteridin-8(9H)-il)benzoil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-[[2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]formilamino]benzoil]-L-Glutámico;

- dihidrógeno fosfato de N-[4-[[2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]metil]amino]benzoil]-L-homoserina;

- ácido N-[[5-[2-[(6R)-2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]etil]-2-tienil]carbonil]-L-Glutámico;

- sal cálcica (1:1) del ácido, N-[4-[[2-amino-5-formil-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-[2-[(6R)-2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il]etil]benzoil]-L-Glutámico;

- 3-amino-8-[4-[[1,3-dicarboxipropil]amino]carbonil]fenil]-1,2,5,6,(6aR),7-hexahidro-1-oxo-imidazo[1,5-f]pteridinio;

- ácido N-[4-[[2-amino-3,4-dihidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]metilamino]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido, N-[4-[[2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-pteridinil]metil]amino]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-[[1,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-6-il]metil]metilamino]benzoil]-L-Glutámico;



## ES 2 345 809 A1

- ácido (2S)-[[4-[[[(2-amino-3,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il)metil]amino]benzoil]amino]-4-sulfo-butanoico;

- ácido N-[4-[[[(2-amino-3,4,7,8-tetrahidro-4-oxo-6-pteridinil)metil]amino]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido N-[4-[[[(2-amino-3,4-dihidro-4-oxo-6-pteridinil)metil]amino]benzoil]-L- $\gamma$ -glutamil-L-glutámico;

- ácido 2-[[4-[[[(2-amino-1,4-dihidro-4-oxopirido[2,3-d]pirimidin-6-il)metil]amino]benzoil]amino]-4-fosfono-butanoico;

- ácido N-[4-[2-(2-amino-1,4,5,6,7,8-hexahidro-4-oxo-6-quinazolinil)etil]benzoil]-L-Glutámico;

- ácido N-(4-aminobenzoil)-L-Glutámico;

- Metotrexato;

- Pemetrexed; y

- Raltitrexed.

12. Sistema quimiosensor según la reivindicación 11, procedimiento según la reivindicación 11 o kit según la reivindicación 11, en los que los dicarboxilatos son folato, metotrexato, pemetrexed o raltitrexed.

FIGURA 1A

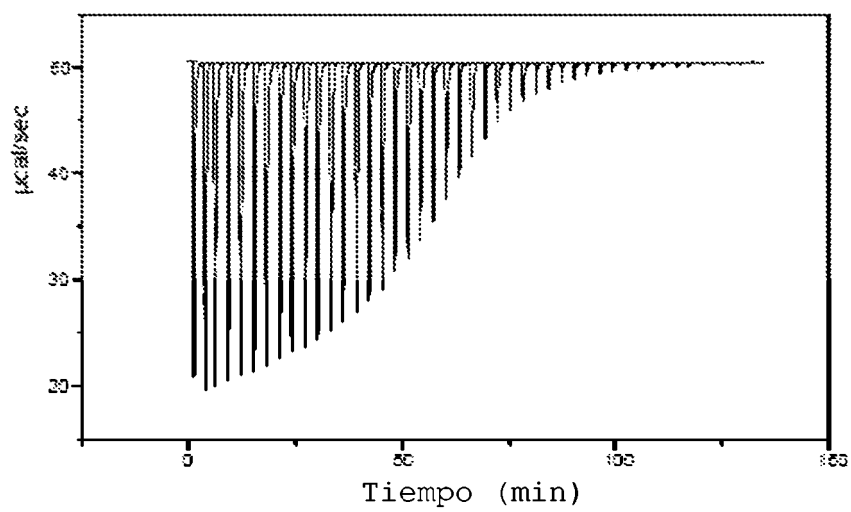


FIGURA 1B

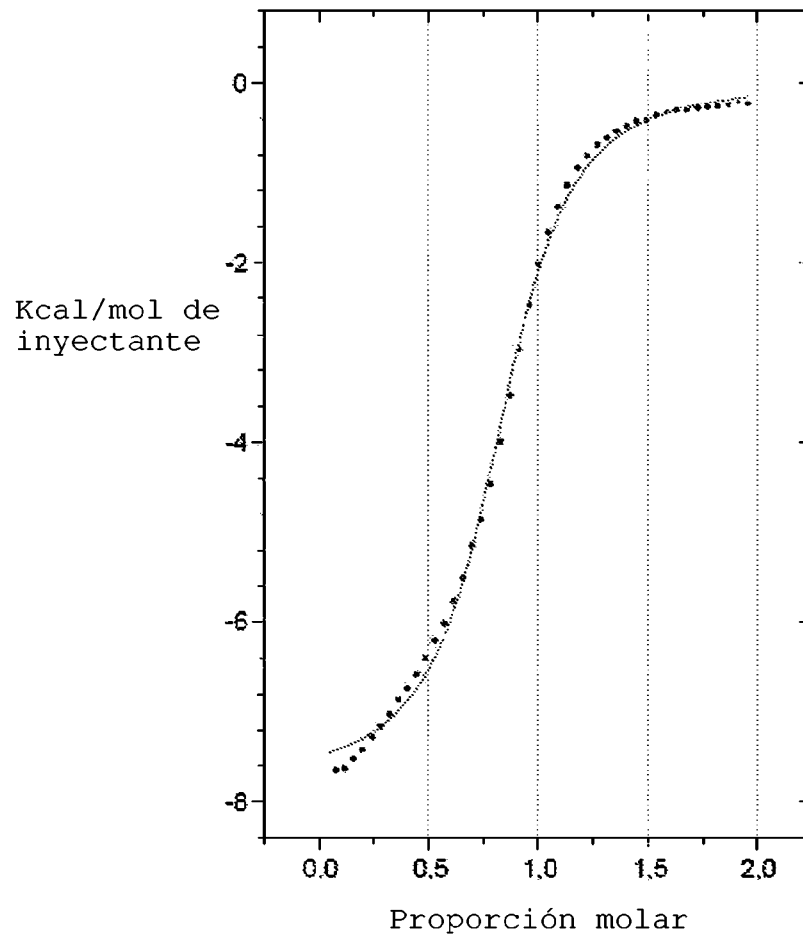


FIGURA 2A

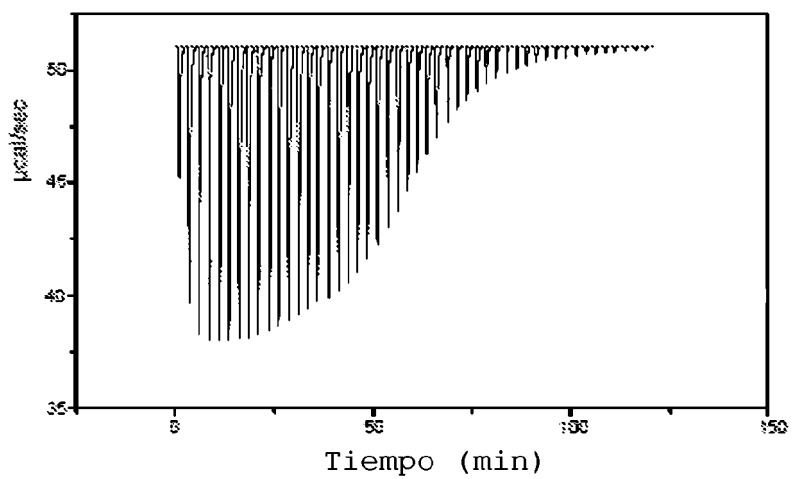


FIGURA 2B

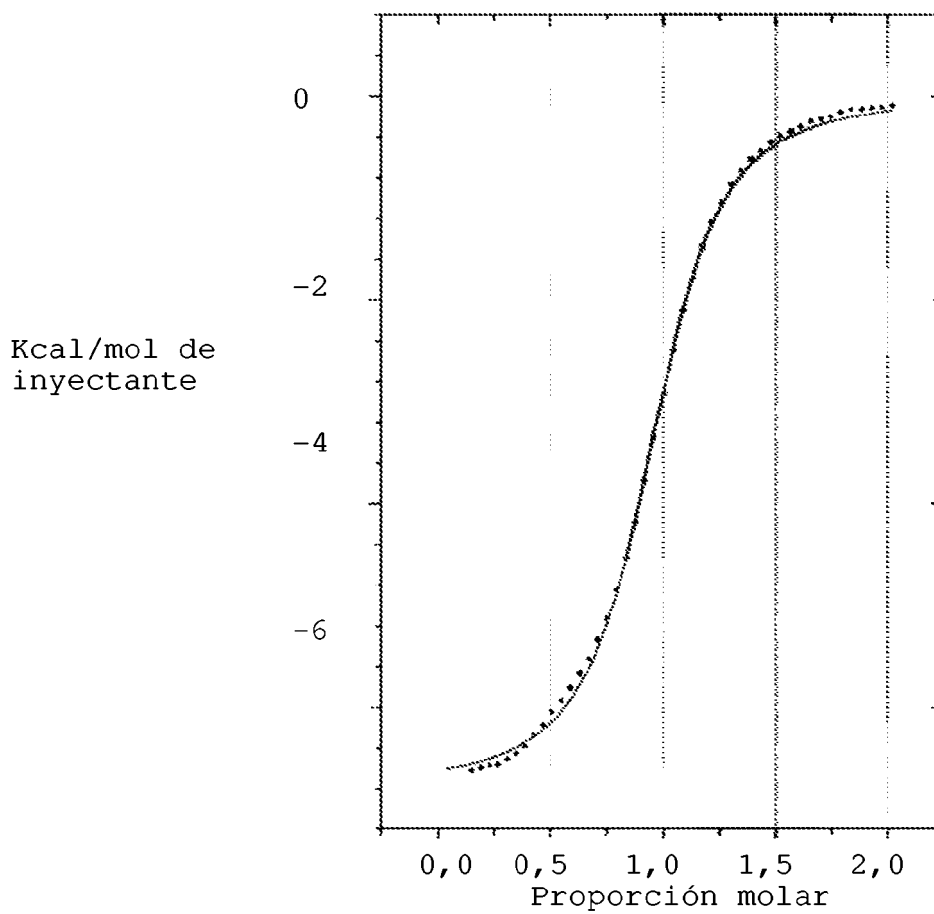


FIGURA 3

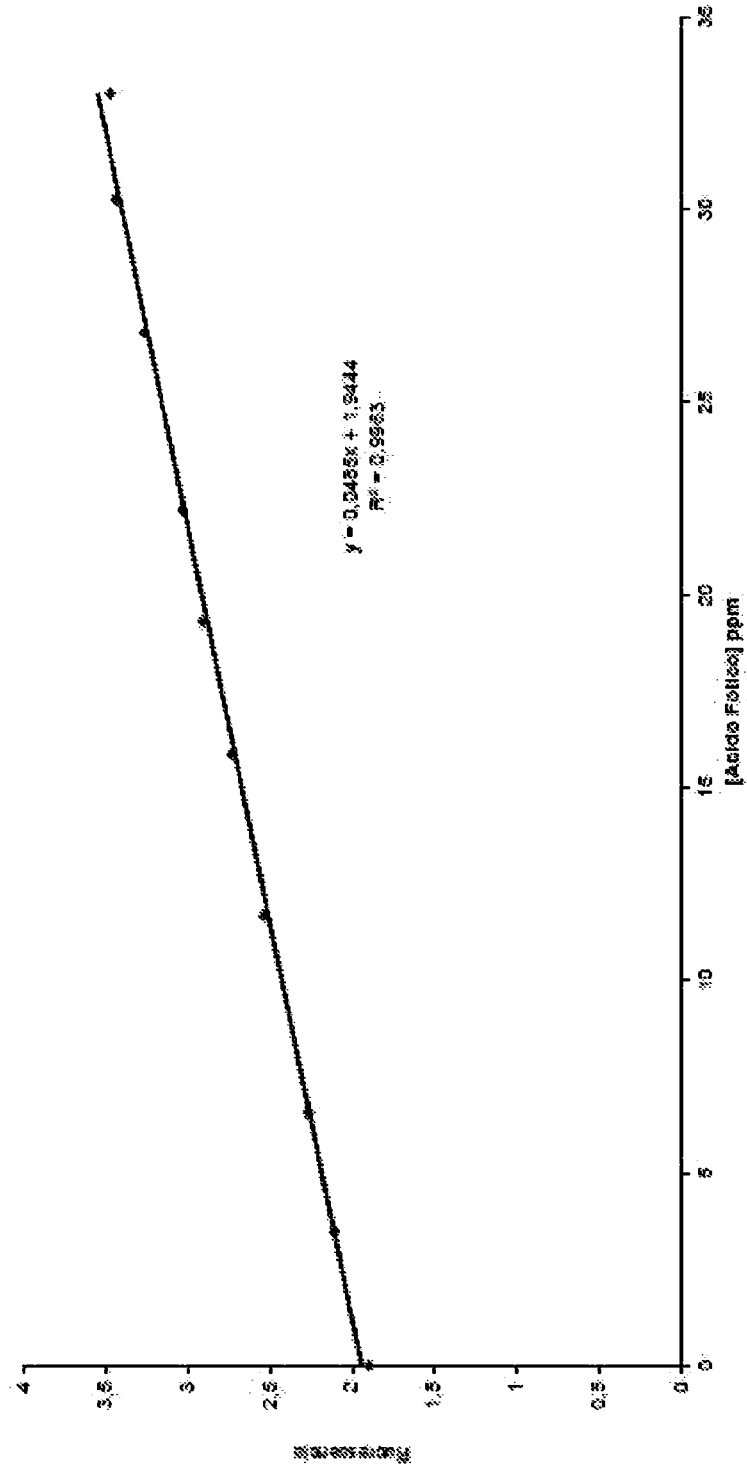
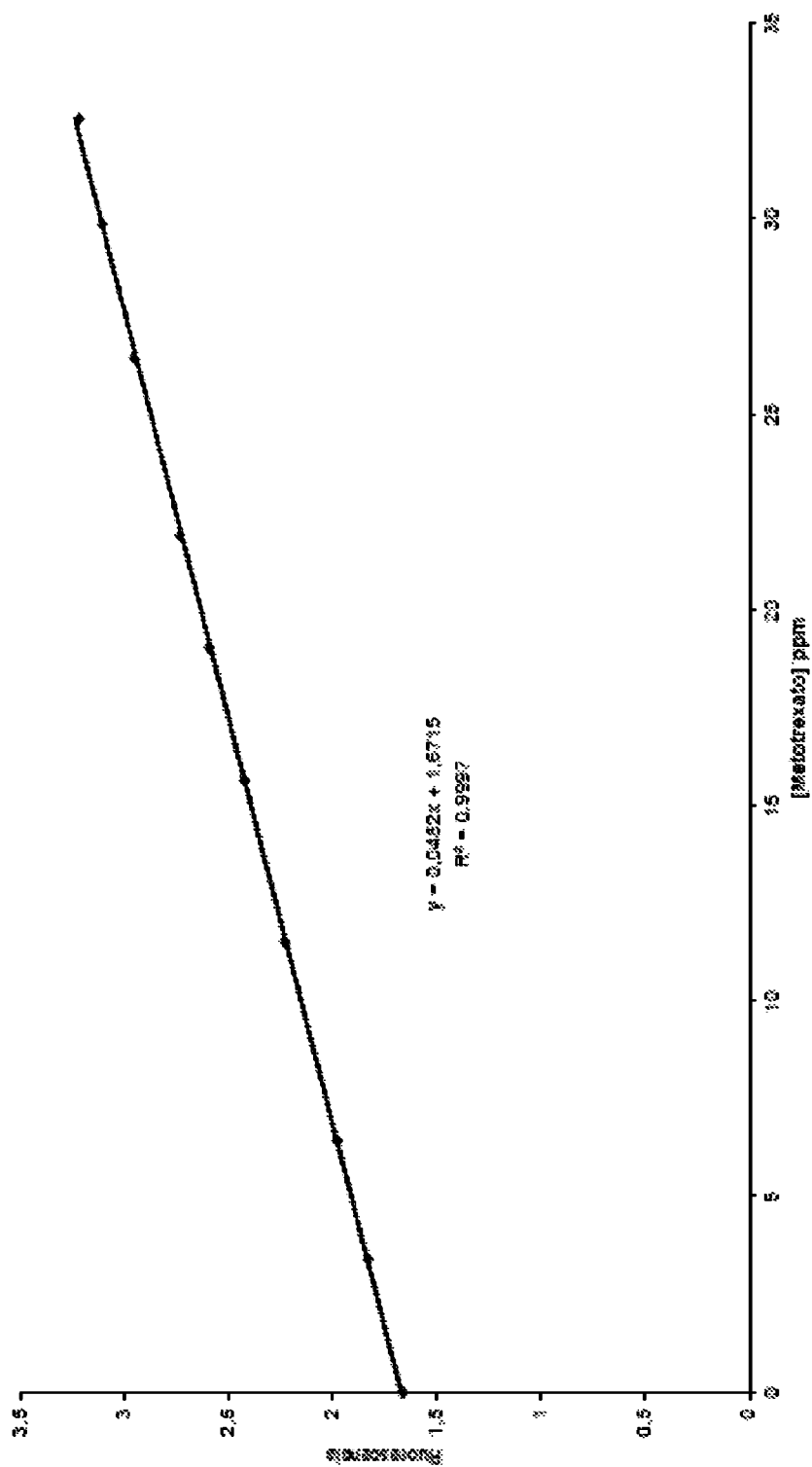


FIGURA 4





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 809

② Nº de solicitud: 200930022

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2009

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
X	A FRONTERA et al., Journal Organic Chemistry 2006, vol. 71 páginas 7185-7195. "Rational design, synthesis and application of a new receptor for the molecular recognition of tricarboxylate salts in aqueous media", todo el documento.	1-9
A		10-12
A	R PROHENS et al., Tetrahedron Letters 1998, vol. 39, páginas 1063-1066. "Squaramido-based receptors: molecular recognition of carboxylate anions in highly competitive media".	1-12

#### 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

25.06.2010

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07C 237/50** (2006.01)

**C07C 237/26** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

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

C07C, G01N

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

INVENES, EPODOC,WPI,CAS



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.06.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	10-12	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-9	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	10-12	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-9	<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	Journal Organic Chemistry 2006, vol 71, págs 7185-7195	12-2006

**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**

La solicitud se refiere a un compuesto tripodal de escuaramida de fórmula I (reivindicación 1), procedimiento para su obtención (reivindicación 3) y su utilización en un sistema quimiosensor para la detección cuantitativa de di y tricarboxilatos en muestras acuosas utilizando un indicador fluorescente (reivindicación 5); también se reivindica el procedimiento para detectar di y tricarboxilatos (concretamente folato y análogos) y el kit que comprende el sistema quimiosensor.

El documento D1 divulga (ver resumen) un receptor tripodal basado en escuaramida (figura 1 página 7188) igual que el compuesto de fórmula I de la reivindicación 1 de la solicitud, para la detección de tricarboxilatos. También divulga el procedimiento para sintetizarlo (ver esquema 1 de D1, página 7188 columna derecha y página 7194 sección experimental) como el descrito en la reivindicación 3 de la solicitud y su utilización para detección de di y tricarboxilatos, así como su uso con fluoresceína para determinaciones fluorimétricas (ver página 7193 de D1 ensayos fluorimétricos con citrato) tal como se describe en las reivindicaciones 7-9 de la solicitud. Se concluye pues que las reivindicaciones 1-9 de la solicitud carecen de novedad a la vista de lo divulgado en D1.

Respecto a las reivindicaciones 10-12 no se ha encontrado divulgada la utilización de un kit basado en escuaramida sustituida por grupos amonio y un indicador fluorescente para la detección de folato y análogos (metotrexato, pemetrexed,...) ni indicación en el estado de la técnica (ver página 7186 columna izquierda de D1) respecto a su utilización como detector de folato y análogos, por lo que se considera que estas reivindicaciones presentan novedad y actividad inventiva. Consecuentemente, las reivindicaciones 1-9 no pueden considerarse nuevas y las reivindicaciones 10-12 presentan novedad y actividad inventiva, tal como establecen los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.