

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 042**

51 Int. Cl.:

C07K 1/13 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2010 E 10188077 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2314597**

54 Título: **Kit y procedimiento para el marcaje de biomoléculas**

30 Prioridad:

21.10.2009 IT BO20090682

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.03.2013

73 Titular/es:

**CYANAGEN SRL (100.0%)
Via degli Stradelli Guelfi, 40/C
40138 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

DELLA CIANA, LEOPOLDO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 042 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Kit y procedimiento para el marcaje de biomoléculas

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a un kit y un procedimiento para el marcaje de biomoléculas.

5 Estado de la técnica

El marcaje de biomoléculas que llevan grupos amino de gran importancia en muchas áreas de la biología y la biotecnología, en particular en los campos del diagnóstico, los inmunoensayos, los ensayos de ácidos nucleicos, la formación de bioimágenes y los tratamientos.

10 Para estos propósitos, el compuesto marcador es, con frecuencia, un isotiocianato, un cloruro de sulfonilo o un éster activo. Actualmente se prefieren los ésteres activos, en particular ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o ésteres de sulfo N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS), véase, p. ej., Hermanson, "Bioconjugated Techniques", Academic Press (1996). Este tipo de ésteres activos se prepara a partir del ácido carboxílico correspondiente y N-hidroxisuccinimidas por medio de carbodiimidas, tales como dicitohexilcarbodiimida (DCC) o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) o carbonilimidazol. De forma alternativa, se puede convertir el ácido carboxílico en el éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) o sulfo-NHS correspondiente por medio de disuccinimidilcarbonato. El éster sólido se aísla, en general como un sólido, y se almacena en condiciones secas.

15 En la mayoría de los casos, los ésteres de NHS y sulfo-NHS son muy sensibles a la humedad y no se pueden purificar fácilmente por cristalización o cromatografía. Por lo tanto, suelen contener cantidades considerables y variables de impurezas, especialmente del ácido carboxílico de partida. En algunos casos, el aislamiento del éster activo produce un gran aumento de la unión inespecífica tras la conjugación, p. ej., el éster de NHS del marcador quimioluminiscente ácido hemisuccínico, hidrazida de ácido 7-(4-aminobutil-N-etil)naftaleno-12-dicarboxílico (ABEN-H) capítulo 3, pág. 146, en "Luminescence Immunoassays and Molecular Applications", Van Dyke y Van Dyke Ed. CRC Press (1990).

20 Los ésteres activos de NHS y sulfo-NHS de determinados compuestos, especialmente tintes fluorescente, tales como cianinas, se deben almacenar en condiciones muy secas. Sin embargo, al contrario que sus precursores de ácido carboxílico, estos ésteres activos suelen ser sensibles a cargas electrostáticas y, por lo tanto, difíciles de pesar. Por lo tanto, la toma de alícuotas de estos ésteres activos, que frecuentemente son caros de fabricar, es engorrosa; además, incluso sus soluciones en DMF o DMSO tienen una estabilidad limitada, siendo sensibles incluso a cantidades mínimas de humedad.

25 Del análisis anterior, se deduce que el uso actual de ésteres activos aislados para marcar biomoléculas suele ser poco fiable y antieconómico. Debido a que tanto los ésteres activos como las biomoléculas que se van a marcar suelen ser muy caros, estos problemas suponen una pérdida económica grave.

Por lo tanto, sería deseable tener un procedimiento para la activación rápida, cuantitativa, *in situ* de un compuesto precursor marcador carboxilado, purificable, estable frente a la humedad.

30 Bruschi *et al.*, Proteomics 9: 460-468, 2009, divulgan un procedimiento para marcar proteínas plasmáticas usando cianinas yodoacetamidossustituidas.

Los documentos US-A-2003/125561 y WO-A-2008/10941 divulgan el uso de sales de uronio y guanidinio, respectivamente, como agentes de acoplamiento en la síntesis de péptidos.

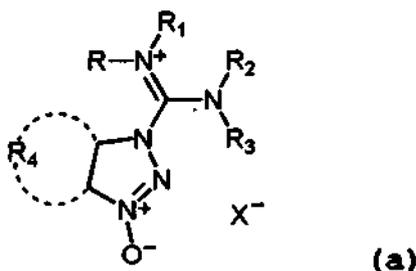
Sumario de la invención

35 Teniendo en cuenta estas premisas, se aprecia por tanto la necesidad de soluciones de mejora, más eficaces, para marcar biomoléculas que llevan grupos hidroxilo o amino reactivos.

De acuerdo con la invención, se consigue el objetivo anterior gracias a la solución requerida en las reivindicaciones que figuran más adelante, que forman parte de la divulgación de la invención como se proporciona en el presente documento.

40 Una realización de la presente invención se refiere a un kit para marcar biomoléculas que llevan grupos hidroxilo o amino reactivos que comprende un primer componente (reactivo A) y un segundo componente (reactivo B), en el que dicho primer componente comprende una mezcla de un compuesto marcador carboxilado y una amina terciaria, y en el que dicho segundo componente comprende:

i) una sal de guanidinio de fórmula (a)



en la que

5 R, R₁, R₂, R₃ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquínilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

R y R₁, cuando se toman conjuntamente, o R₂ y R₃, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o

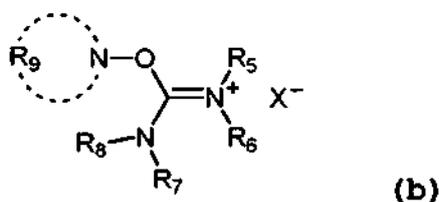
R y R₂, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo guanidinio al que están unidos, y

10 R₄ representa un anillo aromático o heteroaromático de 6 a 10 miembros sustituido o no sustituido, y

X⁻ es un anión;

o

ii) una sal de uronio de fórmula (b)



15 en la que

R₅, R₆, R₇, R₈ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquínilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

20 R₅ y R₆, cuando se toman conjuntamente, o R₇ y R₈, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o R₆ y R₇, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo uronio al que están unidos,

R₉ representa un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que está unido, y

25 X⁻ es un anión,

en el que dicho compuesto marcador carboxilado es un compuesto luminiscente que contiene un resto carboxílico.

30 Una realización adicional de la presente invención se refiere al uso de una mezcla de dicho compuesto marcador carboxilado y una amina terciaria (reactivo A), y una sal de guanidinio de fórmula (a) o una sal de uronio de fórmula (b) (como se definen anteriormente) (reactivo B) para marcar biomoléculas que llevan grupos hidroxilo o amino reactivos.

35 Otra realización más de la presente invención se refiere a un procedimiento para marcar biomoléculas que llevan grupos hidroxilo o amino reactivos con dicho compuesto marcador carboxilado, que comprende i) proporcionar una mezcla del compuesto marcador carboxilado y una amina terciaria (reactivo A), y una entre una sal de guanidinio de fórmula (a) o una sal de uronio de fórmula (b) (como se definen anteriormente) (reactivo B), ii) poner en contacto la mezcla y la sal de guanidinio o la sal de uronio obteniendo un compuesto marcador carboxilado activado; iii) poner en contacto el compuesto marcador carboxilado activado con la biomolécula obteniendo una biomolécula marcada

con el compuesto marcador carboxilado.

Tanto el reactivo A como el reactivo B son químicamente estables durante un periodo de tiempo muy largo cuando se almacenan en ausencia de humedad.

5 El reactivo A puede ser una solución en un disolvente adecuado, tal como un disolvente aprótico polar miscible con agua, tal como DMF, DMSO, y similares. No obstante, en la mayoría de los casos, se puede evaporar a un sólido.

10 El reactivo B consiste en un reactivo de acoplamiento de guanidinio o uronio (activador), tal como tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU). Estos compuestos son activadores potentes bien conocidos en la síntesis de péptidos, p. ej., en Knorr *et al.*, Tet. Lett. 1990, 30, 1927; en Bannwarth y Knorr, Tet. Lett. 1991, 32, 1157; en Carpino *et al.* J. Org. Chem., 1994, 59, 695-698; en el documento US 6.825.347), bien sólidos o disueltos en un disolvente adecuado tal como un disolvente aprótico polar miscible con agua tal como DMF, DMSO, y similares.

Al menos uno de los dos reactivos debe estar en forma de solución.

15 Tras poner en contacto el reactivo A y el reactivo B, se forma rápidamente una forma activada del compuesto marcador carboxilado, en general, de forma cuantitativa. Esta forma activada se puede usar después para marcar de forma fiable y reproducible una biomolécula que lleva grupos hidroxilo o amino reactivos. Los subproductos de la reacción se eliminan fácilmente mediante técnicas de cromatografía, diálisis o ultrafiltración.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 ilustra las fórmulas generales de las sales de uronio (a) y guanidinio (b) usadas como activadores de acuerdo con la presente invención.
- 20 - La figura 2 ilustra gráficamente las etapas necesarias para el uso de los kits marcadores de anticuerpo preparados de acuerdo con la presente invención, a saber (a) preparación de la solución de tinción activada; (b) preparación de la solución de anticuerpo; (c) procedimiento de conjugación; (d) purificación y aislamiento del conjugado.

Descripción detallada de la invención

25 Los kits preparados de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se pueden usar en muchos procedimientos biológicos y biotecnológicos. Por ejemplo, se pueden usar para marcar anticuerpos u otras proteínas. Los anticuerpos o proteínas marcados se pueden usar como reactivos en inmunoensayos u otras técnicas de diagnóstico tales como citometría de flujo, o en formación de bioimágenes, o como reactivos terapéuticos. Los kits de marcaje se pueden emplear con éxito en técnicas de proteómica, tales como la electroforesis diferencial en gel.

30 De forma similar, los kits de la presente invención se pueden usar para marcar nucleótidos aminomodificados que se van a usar en ensayos de ácidos nucleicos.

35 Los kits preparados de acuerdo con la presente invención superan las dificultades del éster activo usado actualmente, proporcionando el compuesto marcador, que contiene un grupo carboxilo, y el reactivo de acoplamiento en envases separados, que se pueden almacenar durante un periodo de tiempo prolongado sin degradarse. No es necesario pesar material sensible a la humedad, caro, ni tomar alícuotas de soluciones que se descomponen rápidamente.

40 Más detalladamente, el kit consiste en un reactivo A y un reactivo B, envasados individualmente, que comprenden: una mezcla de un compuesto marcador carboxilado y una amina terciaria (reactivo A); y un reactivo de acoplamiento (reactivo B). Los dos reactivos se formulan cuidadosamente y se proporcionan para una cantidad determinada de biomoléculas que se van a marcar.

El reactivo A consiste en una mezcla de un compuesto carboxilado y una amina terciaria, sólida o en solución.

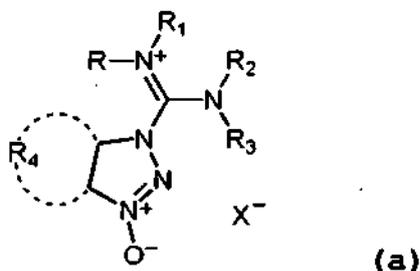
45 El compuesto carboxilado es un compuesto luminiscente que contiene un resto carboxílico, y dicho compuesto luminiscente puede pertenecer a la clase de las cumarinas, fluoresceínas y rodaminas, polimetinas incluidas cianinas y merocianinas, oxazinas, tiazinas, ftalo- y naftalocianinas, diazaindacenos, complejos y quelatos de metales de transición, tales como complejos luminiscentes de Ru (II), Os (II) e Ir (III) con diazinas aromáticas, complejos luminiscentes de Eu (III) y Tb, o

un derivado funcionalizado de luminol y sus análogos, p. ej. hemisuccinamidas de 5-amino-2,3-dihidroftalazino-1,4-diona (o aminobutilisoluminol, ABEI), 6-amino-2,3-dihidroftalazino-1,4-diona, 9-amino-2,3-dihidrobenzo[*f*]ftalazino-1,4-diona (o aminobutil naftol, ABEN), u otros derivados de ftalazina, o ésteres de acridinio carboxil funcionalizados.

50 La amina terciaria del reactivo A puede ser trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, piridina, N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), 4-piperidilpiridina (PPY), 2,4,6-trimetilpiridina (colidina), 4-metilmorfolina, 4-etilmorfolina, 4-morfolinopiridina.

El reactivo B es un reactivo de acoplamiento que comprende una sal de guanidinio (a) o uronio (b).

La sal de guanidinio presenta la fórmula química (a):



en la que

5 R, R₁, R₂, R₃ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquinilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

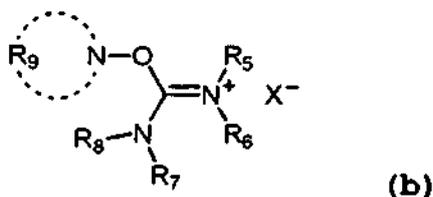
R y R₁, cuando se toman conjuntamente, o R₂ y R₃, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o

10 R y R₂, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo guanidinio al que están unidos,

R₄ representa un anillo aromático y heteroaromático de 6 a 10 miembros sustituido o no sustituido, y

X⁻ es un anión.

La sal de uronio presenta la fórmula química (b):



15 en la que

R₅, R₆, R₇, R₈ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquinilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

20 R₅ y R₆, tomados conjuntamente, o R₇ y R₈, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o R₆ y R₇, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo uronio al que están unidos,

R₉ representa un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que está unido,

25 X⁻ es un anión.

De forma ventajosa, la sal de guanidinio o uronio se escoge entre los siguientes compuestos disponibles comercialmente: hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), o tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), o hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), o tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU), o hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (HSTU), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxidimetilamino-morfolin-carbenio) (COMU). Cabe señalar que la nomenclatura usada comúnmente para los compuestos HATU, HBTU, TBTU es engañosa, ya que atribuye a estos compuestos la estructura de uronio, en lugar de la estructura de guanidinio correcta de fórmula (a).

30

El reactivo A y el reactivo B se formulan bien como sólidos o como soluciones, y cuando se formulan como solución el disolvente es un disolvente aprótico polar miscible con agua seleccionado de N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, acetonitrilo; al menos uno de los dos reactivos se formula

35

como una solución.

La cantidad de amina terciaria usada en la formulación del reactivo A está en una proporción molar de 1:1 a 10:1 con respecto al compuesto marcador carboxilado, mientras que la cantidad de reactivo de acoplamiento usada en la formulación del reactivo B está en una proporción molar de 1:1 a 10:1 con respecto al compuesto marcador carboxilado.

Los componentes del kit se pueden almacenar hasta que se necesiten durante un periodo de tiempo prolongado. De forma ventajosa, el kit se proporciona para una cantidad específica de la biomolécula que se va a marcar, de forma que no es necesario pesar o tomar alícuotas, y se usa solamente la cantidad necesaria de compuesto marcador.

La activación del compuesto marcador carboxilado se produce tras poner en contacto el reactivo A y el reactivo B. La activación se lleva a cabo a una temperatura entre 0 y 60 °C durante hasta 60 minutos.

Una aplicación especialmente ventajosa del kit de marcaje de la presente invención es en el marcaje de proteínas para electroforesis en gel 2-D; véase, p. ej. "Proteomics" por Renders y Sickman, Ed., Methods in Molecular Biology, vol. 564, 2009, Humana Press. Para esta aplicación, de hecho, se usan comercialmente cantidades minúsculas de ésteres activos de tres tintes monocationicos de tamaño coincidente en solución de DMF. En esta forma tienen una estabilidad muy limitada y escasa reproducibilidad, ya que un tinte (pentametinindocianina) es más inestable hidrolíticamente y fotoquímicamente que los otros dos tintes (trimetinindocianina y trimetinoxacianina).

Estos problemas se evitan usando el kit de la presente invención, donde los tres tintes se almacenan en una forma de ácido carboxílico estable, que se activa sólo cuando es necesario.

De la siguiente descripción de algunos ejemplos que son puramente ilustrativos y no limitantes, surgirán características adicionales de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de un kit para el marcaje de anticuerpos con un tinte fluorescente o luminógeno

El kit consiste en dos viales, uno que contiene el reactivo A y otro que contiene el reactivo B. La cantidad de reactivos se ha optimizado para el marcaje de 1 mg (6,7 nmol) de IgG (FR 150.000 dalton). Así, el kit contiene 15 equivalentes de marca (ácido carboxílico) (100 nmol), 16,5 equivalentes de 4-dimetilamino piridina (DMAP) y 16,5 equivalentes de tetrafluoroborato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(*N*-succinimidil)uronio (TSTU, 110 nmol) con respecto a la IgG.

Reactivo A (marca + amina terciaria). Contenido: cada vial criogénico de fondo cónico de 1,5 ml con tapa de junta tórica contiene 100 nmol de marca (ácido carboxílico) y 110 nmol de DMAP.

Se preparan soluciones madre disolviendo 2 µmol del marcador (ácido carboxílico) en 1 ml de metanol u otro disolvente volátil y 1,07 mg (8,75 µmol) de DMAP en 4 ml de metanol.

Se añaden 50 µl de cada solución a un vial criogénico de fondo cónico de 1,5 ml y se evapora el disolvente usando un evaporador rotatorio o una centrifuga evaporadora.

El residuo, que se deposita como una película sobre el fondo del vial, se seca adicionalmente a vacío.

Después, se almacena el vial en oscuridad en argón, a -20 °C, en un desecador.

Reactivo B (activador). Cada vial criogénico de fondo cónico de 0,5 ml con tapa de junta tórica contiene 70 µl de una solución 3 mM de TSTU en DMF anhidra.

Se prepara una solución madre disolviendo 3,31 mg (11 µmol) de TSTU en 5 ml de DMF seca en argón. Se pipetea alícuotas de 70 µl en viales criogénicos de fondo cónico de 0,5 ml, se cierran y se almacenan en argón a -20 °C, en un desecador.

El kit se ensambla colocando los viales que contienen reactivo A y reactivo B junto con una bolsa con desecante dentro de una bolsa de película de barrera (aluminio/polietileno), que después se sella con calor y se almacena a -20 °C.

Ejemplo 2

Marcaje de un anticuerpo con un tinte fluorescente o luminógeno usando el kit del ejemplo 1

Etapa 1. Preparación de la solución de tinción activada (figura 2a). Se calienta el kit hasta temperatura ambiente. Se añaden 50 µl de reactivo B (solución de activador) al vial que contiene el reactivo A. Se tapa el vial y se disuelve el tinte mediante agitación en vórtex; la mezcla se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min (figura 2a).

Etapa 2. Preparación de la solución de anticuerpo (figura 2b). Cada kit está diseñado para marcar 1 mg de IgG (PM 150.000) a 2 mg/ml de solución. Se debe disolver el anticuerpo en un tampón sin aminos. Para la solución tampón de anticuerpo: a 450 μ l de anticuerpo diluido a 2,2 mg/ml con tampón PBS, se les añaden 50 μ l de tampón bicarbonato 1M, a pH 8,5. Para anticuerpos sólidos: se disuelve 1 mg de anticuerpo en 0,5 ml de tampón bicarbonato 0,1 M, a pH 8,5 (figura 2b).

Etapa 3. Procedimiento de conjugación (figura 2c). Se añade la solución de anticuerpo en tampón (de la etapa 2) al vial que contiene la solución de tinción (de la etapa 1). Se tapa el vial, se mezcla suavemente (sin agitación en vórtex) y se incuba la solución a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 h, agitando cada 15 min.

Etapa 4. Purificación y aislamiento del conjugado (figura 2d). El producto conjugado se separa del tinte sin reaccionar y los subproductos de la reacción por cromatografía de permeación en gel, p. ej. en Sefadex™ G25. Se equilibra una columna de cromatografía con PBS o el tampón deseado, se añade la mezcla de reacción de la etapa 3 y se eluye con el mismo tampón. Se recoge la primera banda coloreada, que contiene el conjugado de tinte/anticuerpo. De forma alternativa, se pueden usar columnas de centrifugación disponibles comercialmente. Se puede conseguir una separación menos eficaz por diálisis o ultrafiltración.

15 Ejemplo 3

Marcaje de proteínas para electroforesis en gel de fluorescencia 2-D (DIGE 2-D)

Los kits de marcaje están específicamente diseñados para la detección de proteínas en aplicaciones de electroforesis en gel de diferencia de fluorescencia 2-D (DIGE 2-D). El enfoque de marcaje mínimo requiere una concentración reducida al mínimo del tinte con el fin de marcar cada proteína con una sola molécula de tinte. El marcaje se produce formando un enlace covalente entre el grupo ϵ -amino de la lisina de las proteínas y el tinte activado.

Para un análisis de DIGE-2D típico de marcaje mínimo se necesitan tres marcas de tinción, con longitudes de onda de absorción aproximadas a 490, 550 y 645 nm. Los tintes deben ser:

- monocatiónicos. Una carga positiva intrínseca de cada tinte reemplaza la de la lisina, dejando la carga total de la proteína sin cambios.
- de tamaño coincidente. Todos los tintes tienen peso molecular y forma similares para evitar afectar a la migración de proteínas.
- no sensibles al pH: no se observa afectación de la señal a lo largo de un intervalo de pH amplio.

Además, es necesario un brillo alto del tinte, para una sensibilidad alta.

Por ejemplo, los tintes que pertenecen a la clase de las cianinas pueden cumplir este requisito.

Preparación del kit

Se preparan tres kits separados, uno para cada tinte. Cada kit consiste en dos viales. Un vial contiene la mezcla de tinte/amina terciaria, mientras que el otro contiene el activador. Por ejemplo, se pueden preparar kits diseñados para 20 nmol de tinte como sigue:

Vial de tinte de DIGE 2-D/amina terciaria. Se usan tres tintes de DIGE, una pentametínindocianina monocatiónica, una trimetínindocianina monocatiónica y una trimetínioxacianina monocatiónica, respectivamente. Se preparan las siguientes soluciones madre: se disuelven 1,08 mg de DMAP en 10 ml de DMF seca; se introducen 4 micromoles de tinte de DIGE en un matraz volumétrico ámbar de 5 ml y se añaden 5 ml de la solución madre de DMAP. Se disuelve el tinte y se tapa el matraz en argón y se almacena a -20 °C. Se pipetea alícuotas de 25 μ l en viales criogénicos de fondo cónico de 0,5 ml. Los viales se almacenan en oscuridad con un desecante en argón a -20 °C.

Vial de activador. Solución madre: se disuelven 1,32 mg de TST en 5 ml de DM anhidro en argón en un matraz volumétrico ámbar de 5 ml, en oscuridad, con un desecante, en argón a -20 °C. Se pipetea alícuotas de 25 μ l en viales criogénicos de fondo cónico de 0,5 ml. Los viales se almacenan en oscuridad con un desecante en argón a -20 °C.

El kit se ensambla colocando los dos viales, junto con una bolsa con desecante dentro de una bolsa de película de barrera (aluminio/polietileno), que después se sella con calor y se almacena a -20 °C.

Cada kit de marcaje mínimo de DIGE-2 contiene 20 nmol del tinte de DIGE-2 disueltos en 25 μ l de DMF seca sin aminos, que permiten realizar hasta 50 reacciones de marcaje.

La solución de trabajo se obtiene mezclando volúmenes iguales de las dos soluciones suministradas. Una reacción de marcaje típica sobre 50 μ g de proteína requiere 1 μ l de la solución de trabajo de marcaje, obtenida mezclando 0,5 μ l de tinte de DIGE-2D y 0,5 μ l de activador. Para reducir la mínima los errores de pipeteo, se puede aumentar la escala de la reacción de marcaje según convenga.

Procedimiento de activación.

Se saca el kit del congelador y se calienta hasta temperatura ambiente durante 5 minutos. Se insertan los viales en una microcentrífuga y se centrifugan brevemente para recoger las soluciones del fondo de los viales. La solución de trabajo de marcaje se obtiene como sigue:

- 5
- se pipetea volúmenes iguales de tinte de DIGE 2-D/amina terciaria y solución de activador en un tubo de microcentrífuga nuevo;
 - se tapa el tubo, se mezcla mediante agitación en vórtex y se centrifuga durante unos segundos, después se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos;
 - la solución de trabajo de marcaje tendrá una concentración de 400 pmol/μl en el tinte activo.
- 10
- Típicamente, la solución de trabajo se prepara inmediatamente antes de su uso. En caso necesario, se puede almacenar la solución de trabajo a -20 °C durante hasta una semana.

Protocolo de marcaje

15

La concentración de proteína recomendada en el lisado celular está en el intervalo de 5-10 mg/ml, de forma que 50 μg de proteína se reparten en 10 y 5 μl respectivamente, pero también se pueden marcar muestras que contienen 1 mg/ml de proteína.

El pH de la solución de proteína tiene que ser de 8,5 para garantizar la máxima eficacia.

Para marcar 50 μg de proteína se recomiendan 400 pmol del tinte activo. Se procede como sigue:

- disponer la solución de lisado celular que contiene 50 μg de proteína en un tubo de microcentrífuga;
 - añadir 1 μl de la solución de trabajo de marcaje que contiene 400 pmol del tinte activo al mismo tubo;
- 20
- mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo y centrifugar brevemente;
 - incubar en hielo durante aproximadamente 30 minutos en oscuridad;
 - desactivar la reacción de marcaje añadiendo 1 μl de solución de lisina 10 mM: mezclar mediante agitación en vórtex y centrifugar unos segundos, después, mantener en oscuridad en hielo durante 10 minutos.

25

Ahora, la solución de proteína marcada está lista para procesarla, en caso contrario, almacenar a -70 °C en oscuridad.

Ejemplo 4**Marcaje de oligonucleótidos aminomodificados**

30

Se desarrolló específicamente un kit de marcaje para ofrecer las condiciones ideales para el marcaje de hebras de ADN y ARN amino alil modificados. La cantidad de marca para cada kit está ajustada para dar un valor óptimo de 20-50 moléculas de marca por 1000 nucleótidos.

El kit consiste en dos viales, uno que contiene el reactivo A y otro que contiene el reactivo B. La cantidad de reactivos se ha optimizado para el marcaje de 5-20 mg (6,7 nmol) de aminoalil ARNa; ARNa = ARNantisentido. Por tanto, el kit contiene 40 nmol de marca de ácido carboxílico, 60 nmol de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y 60 nmol de tetrafluoroborato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(N-succinimidil) uronio (TSTU) en DMF seca.

35

Reactivo A (marcador + amina terciaria). Contenido: cada vial criogénico de fondo cónico sin ADNAsas ni ARNAsas de 0,5 ml con tapa de junta tórica contiene 40 nmol de marcador (ácido carboxílico) y 60 nmol de DMAP. Se prepara una solución madre disolviendo 7,2 μmol de marca de ácido carboxílico y 1,31 mg de DMAP en 5 ml de metanol en un vial ámbar de 5 ml. Se pipetea alícuotas de 27,8 μl de esta solución en un vial criogénico de fondo cónico de 0,5 ml y se evapora el disolvente usando un evaporador rotatorio o una centrífuga evaporadora. El residuo, que se deposita como una película sobre el fondo del vial, se seca adicionalmente a vacío. Después, se almacena el vial en oscuridad en argón, a -20 °C, en un desecador.

40

Reactivo B (activador). Contenido: cada vial criogénico de fondo cónico sin ADNAsas ni ARNAsas de 0,5 ml con tapa de junta tórica contiene 20 μl de una solución de TSTU. Se prepara una solución madre disolviendo 8,20 mg de TSTU en 5 ml de DMF seca en argón, en un vial de vidrio de 5 ml. Se pipetea alícuotas de 20,0 μl de esta solución en un vial criogénico de fondo cónico de 0,5 ml. Después, se almacena el vial en oscuridad en argón, a -20 °C, en un desecador.

45

El kit se ensambla colocando los viales que contienen reactivo A y reactivo B junto con una bolsa desecante dentro de un bolsillo de película de barrera (aluminio/polietileno), que después se sella con calor y se almacena a -20 °C.

ES 2 398 042 T3

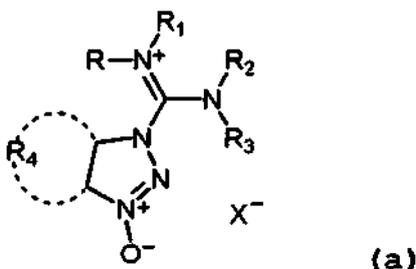
Protocolo de marcaje - Se desarrolló el siguiente protocolo para marcar nucleótidos amino alil modificados usando el kit de marcaje.

- 5 Etapa 1 - Preparación de la solución de marcador activado. Dejar que el kit se caliente hasta temperatura ambiente. Añadir 11 µl de solución de reactivo B (activador) al vial de reactivo A (marca + amina terciaria). Tapar el vial, disolver el tinte mediante agitación en vórtex y mantenerlo en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Etapa 2 - Preparación de la solución de ARNa. Cada kit está diseñado para marcar a temperatura ambiente. Cada kit está diseñado para marcar 5-20 µg de ARNa amino alil modificado. Secar la cantidad deseada de muestra de ARNa, usando, por ejemplo, una centrifuga a vacío. Asegurarse de no secarla en exceso. Añadir 9 µl de tampón de acoplamiento (solución de bicarbonato sódico 0,1 M a pH 8,7).
- 10 Etapa 3 - Procedimiento de conjugación. Añadir todo el tinte CHROMIS activado (11 µl de la etapa 1) al tubo de ARNa para llevar el volumen total a 20 µl. Pipetear varias veces para mezclar bien e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante al menos 30-60 minutos. Para desactivar la reacción, añadir 4,5 µl de una solución de hidroxilamina 4 M e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Proceder a la purificación de las sondas de ARNa marcadas por HPLC o usando protocolos y cartuchos de purificación adecuados.
- 15 Evidentemente, sin perjuicio del principio subyacente a la invención, los detalles de construcción y las realizaciones pueden variar, incluso en gran medida, con respecto a lo que se ha descrito e ilustrado puramente a modo de ejemplo, sin alejarse del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un kit para marcar biomoléculas que llevan grupos hidroxilo o amino reactivos que comprende un primer componente (reactivo A) y un segundo componente (reactivo B) en envases separados, en el que dicho primer componente comprende una mezcla de un compuesto marcador carboxilado y una amina terciaria, y en el que dicho segundo componente comprende:

i) una sal de guanidinio de fórmula (a)



en la que

10 R, R₁, R₂, R₃ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquino sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

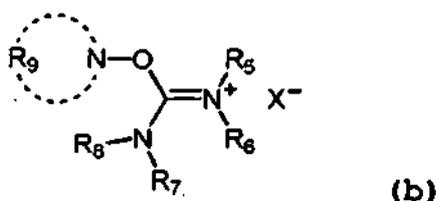
R y R₁, cuando se toman conjuntamente, o R₂ y R₃, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o

15 R y R₂, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo guanidinio al que están unidos, y

R₄ representa un anillo aromático y heteroaromático de 6 a 10 miembros sustituido o no sustituido, y

X⁻ es un anión; o

ii) una sal de uronio de fórmula (b)



20 en la que

R₅, R₆, R₇, R₈ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquino sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

25 R₅ y R₆, tomados conjuntamente, o R₇ y R₈, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o R₆ y R₇, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo uronio al que están unidos, y

R₉ representa un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que está unido, y

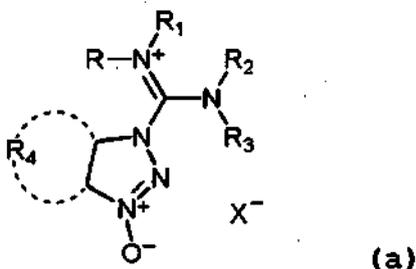
30 X⁻ es un anión,

en el que dicho compuesto marcador carboxilado es un compuesto luminiscente que contiene un resto carboxílico.

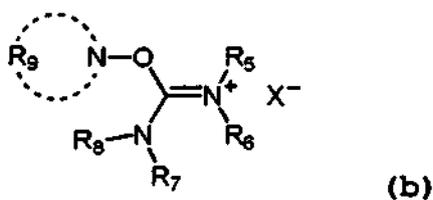
2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto luminiscente se selecciona de cumarinas que contienen un resto carboxílico, fluoresceínas que contienen un resto carboxílico y rodaminas que contienen un resto carboxílico, polimetinas que contienen un resto carboxílico, incluidas cianinas, merocianinas, oxazinas, tiiazinas, ftalo- y naftalocianinas, diazaindacenos, 2,3-dihidroftalazino-1,4-dionas amino sustituidas, 2,3-

dihidrobenzo[*ff*]ftalazino-1,4-dionas amino sustituidas, ésteres de acridinio que contienen un resto carboxílico, complejos luminiscentes de Ru (II), Os (II) e Ir (III) con diazinas aromáticas que contienen un resto carboxílico, complejos luminiscentes de Eu (III) y Tb (III) que contienen un resto carboxílico, un derivado carboxil funcionalizado de luminol y sus análogos.

- 5 3. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha amina terciaria se selecciona de trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, piridina, N,N-dimetilaminopiridina, 2,4,6-trimetilpiridina (colidina), 4-metilmorfolina, 4-etilmorfolina, 4-morfolinopiridina.
4. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer componente y dicho segundo componente se formulan como sólidos o como soluciones.
- 10 5. El kit de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho primer componente y dicho segundo componente se formulan como soluciones, seleccionándose el disolvente de N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, sulfolano, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, acetonitrilo.
6. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de dicho segundo componente está en una proporción molar de 1:1 a 10:1 con respecto a dicho compuesto marcador carboxilado.
- 15 7. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha sal de guanidinio de fórmula (a) se selecciona de hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU).
8. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha sal de uronio de fórmula (b) se selecciona de tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU), o hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (HSTU), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolin-carbenio (COMU).
9. Uso de un compuesto marcador carboxilado, una amina terciaria y un compuesto entre
- i) una sal de guanidinio de fórmula (a)



- 25 en la que
- R, R₁, R₂, R₃ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquino sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o
- 30 R y R₁, cuando se toman conjuntamente, o R₂ y R₃, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o
- R y R₂, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo guanidinio al que están unidos, y
- R₄ representa un anillo aromático y heteroaromático de 6 a 10 miembros sustituido o no sustituido, y
- 35 X⁻ es un anión; o
- ii) una sal de uronio de fórmula (b)



en la que

R₅, R₆, R₇, R₈ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquino sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

R₅ y R₆, tomados conjuntamente, o R₇ y R₈, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o R₆ y R₇, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo uronio al que están unidos,

R₉ representa un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que está unido, y

X⁻ es un anión,

para marcar biomoléculas que llevan grupos hidroxilo o amino reactivos, en el que dicho compuesto marcador carboxilado es un compuesto luminiscente que contiene un resto carboxílico.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho compuesto luminiscente se selecciona de cumarinas que contienen un resto carboxílico, fluoresceínas que contienen un resto carboxílico y rodaminas que contienen un resto carboxílico, polimetinas que contienen un resto carboxílico, incluidas cianinas, merocianinas, oxazinas, tiazinas, ftalo- y naftalocianinas, diazaindacenos, 2,3-dihidroftalazino-1,4-dionas amino sustituidas, 2,3-dihidrobenzo[*ff*]ftalazino-1,4-dionas amino sustituidas, ésteres de acridinio que contienen un resto carboxílico, complejos luminiscentes de Ru (II), Os (II) e Ir (III) con diazinas aromáticas que contienen un resto carboxílico, complejos luminiscentes de Eu (III) y Tb (III) que contienen un resto carboxílico, un derivado carboxil funcionalizado de luminol y sus análogos.

11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que dicha amina terciaria se selecciona de trietilamina, N,N-diisopropil-etilamina, piridina, N,N-dimetilaminopiridina, 2,4,6-trimetilpiridina (colidina), 4-metilmorfolina, 4-etilmorfolina, 4-morfolinopiridina.

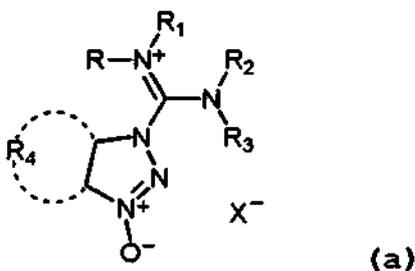
12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha sal de guanidinio de fórmula (a) se selecciona de hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil uronio (HBTU), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU).

13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha sal de uronio de fórmula (b) se selecciona de tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU), o hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (HSTU), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)dimetilamino-morfolin-carbenio (COMU).

14. Un procedimiento para marcar biomoléculas que llevan grupos hidroxilo o amino reactivos con un compuesto marcador carboxilado, que comprende

i) proporcionar en envases separados una mezcla del compuesto marcador carboxilado y una amina terciaria, y una entre:

- una sal de guanidinio de fórmula (a)



en la que

R, R₁, R₂, R₃ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquinilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

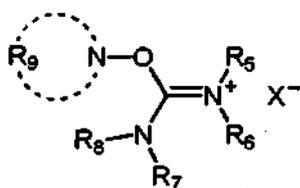
- 5 R y R₁, cuando se toman conjuntamente, o R₂ y R₃, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o

R y R₂, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo guanidinio al que están unidos, y

R₄ representa un anillo aromático y heteroaromático de 6 a 10 miembros sustituido o no sustituido, y

- 10 X⁻ es un anión; o

- una sal de uronio de fórmula (b)



en la que

- 15 R₅, R₆, R₇, R₈ se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y alquinilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, o

R₅ y R₆, tomados conjuntamente, o R₇ y R₈, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos, o R₆ y R₇, cuando se toman conjuntamente, constituyen un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el grupo uronio al que están unidos, y

- 20 R₉ representa un anillo heterocíclico de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido que incluye el átomo de nitrógeno al que está unido, y

X⁻ es un anión;

- 25 ii) poner en contacto la mezcla y la sal de guanidinio o la sal de uronio obteniendo un compuesto marcador carboxilado activado;

iii) poner en contacto el compuesto marcador carboxilado activado con la biomolécula obteniendo una biomolécula marcada con el compuesto marcador carboxilado

en el que el compuesto marcador carboxilado es un compuesto luminiscente que contiene un resto carboxílico.

- 30 15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha operación ii) se realiza a una temperatura de entre 0 y 60 °C durante un periodo de tiempo de hasta 60 minutos.

16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que dicha operación iii) se realiza a una temperatura de entre 4 y 50 °C durante un periodo de tiempo de hasta 24 horas.

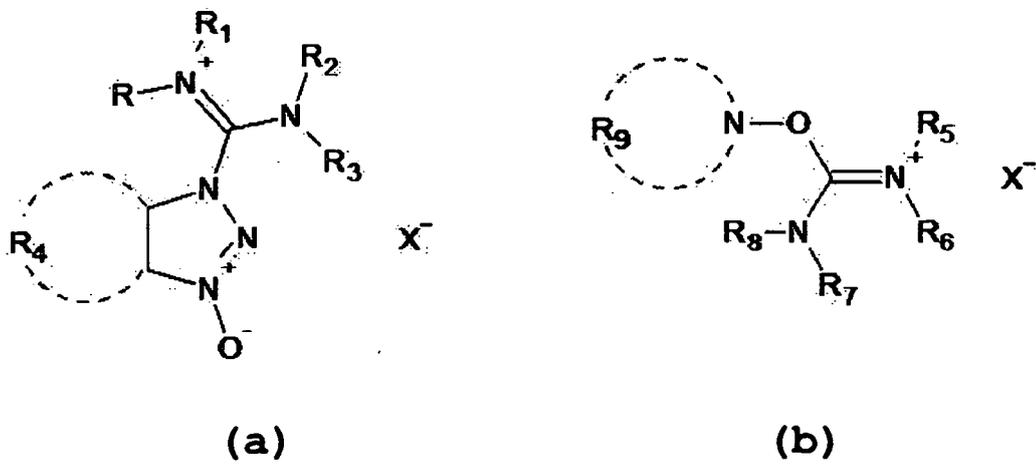


Figura 1

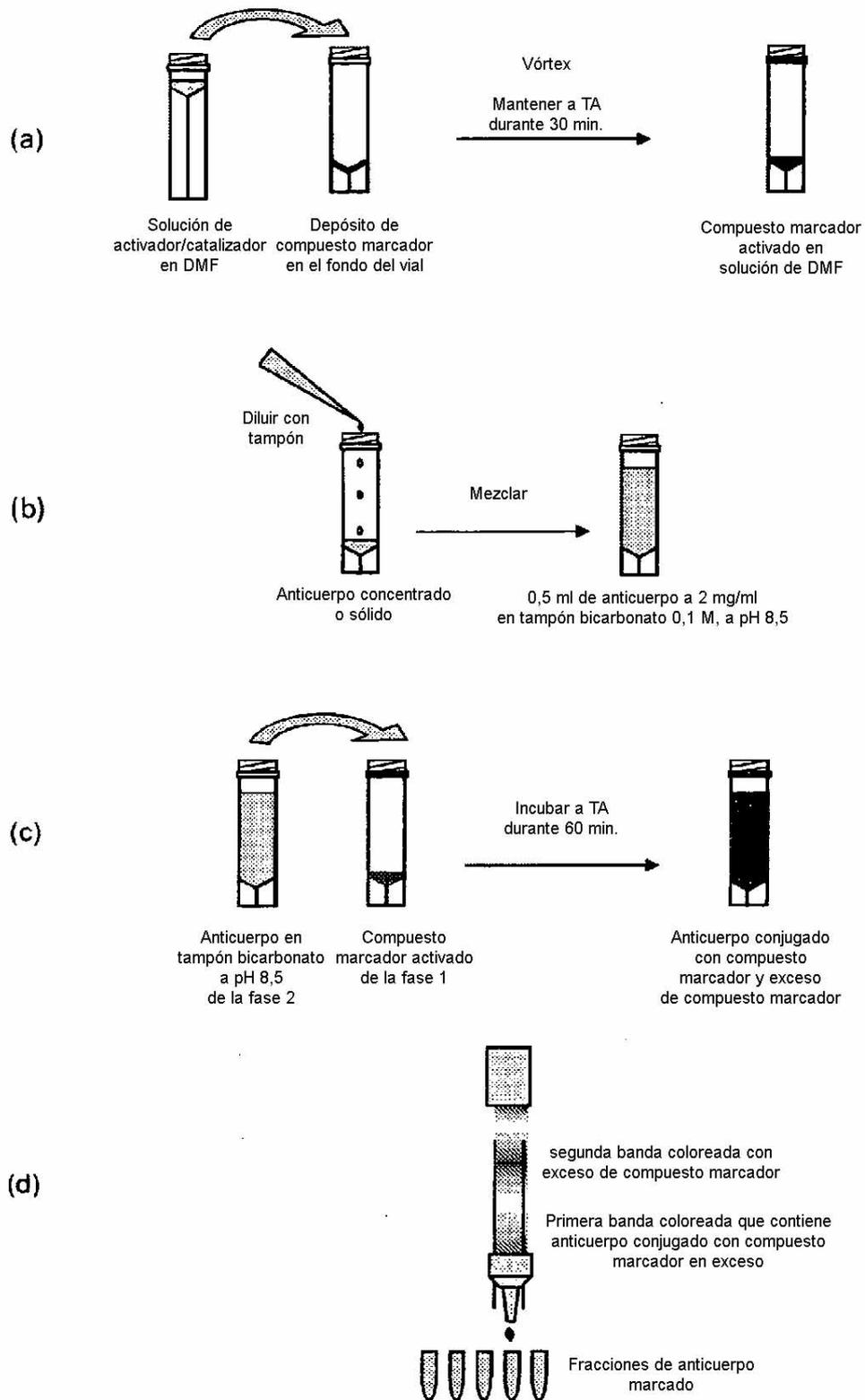


Figura 2