

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 682**

51 Int. Cl.:

C07F 9/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2005 E 05824048 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1817319**

54 Título: **Derivados del inositol-fosfato y procedimiento de detección del inositol-1-fosfato**

30 Prioridad:

02.12.2004 FR 0412797

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

07.10.2013

73 Titular/es:

**ION BEAM APPLICATIONS S.A. (100.0%)
Chemin due Cyclotron 3
1348 Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:

**BAZIN, HERVÉ;
ANSANAY, HERVÉ;
TRINQUET, ERIC y
MATHIS, GÉRARD**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 424 682 T3

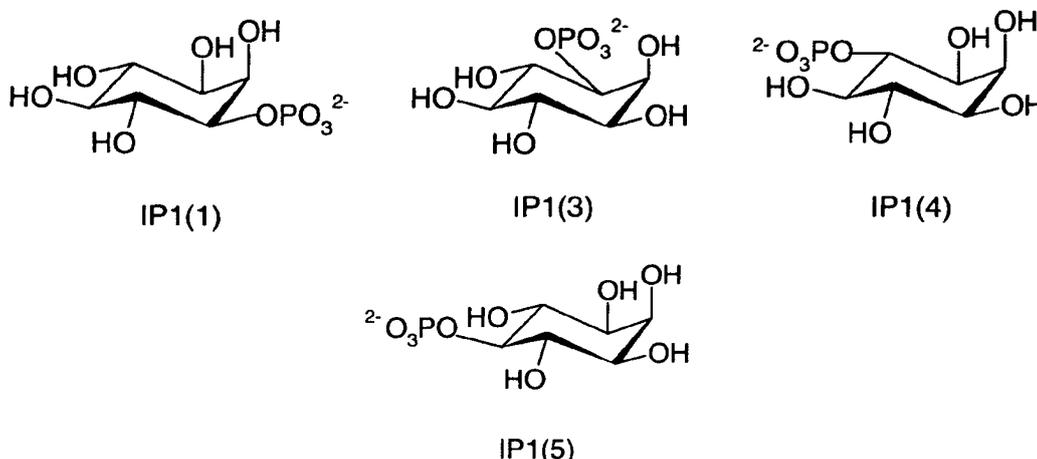
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Derivados del inositol-fosfato y procedimiento de detección del inositol-1-fosfato

5 La presente invención tiene por objeto derivados del inositol-fosfato y proporciona nuevas herramientas que permiten el estudio del ciclo de los inositol-fosfatos y, por lo tanto, indirectamente el estudio de los receptores de siete dominios de transmembrana (receptores 7TM) copulados a la fosfolipasa C (PLC), de los receptores que tienen una actividad de tirosina kinasa y, en general, de las enzimas implicadas en las variaciones de la concentración intracelular de IP1.

10 El término "inositol-fosfato" designa un compuesto de la familia de los ciclitoles de tipo ciclohexano que lleva un grupo hidroxilo en cada carbono (1,2,3,4,5,6-hexahidroxociclohexanos). El compuesto natural más representado es el *mio*-inositol, cuyos grupos hidroxilo en las posiciones 1, 2, 3 y 5 están situados en una de las caras del anillo de ciclohexano y cuyos dos grupos hidroxilo en las posiciones 4 y 6 están situados en la otra cara. Los compuestos naturales producidos en el curso del ciclo de los fosfatos de inositol son fosfatos de *D-mio*-inositol, cuyo fosfato se encuentra en la posición 1, 3, 4 ó 5 del anillo del inositol. Estos compuestos son generalmente denominados «IP1», en contraposición, por ejemplo, al IP2 (bisfosfato de inositol) o al IP3 (trisfosfato de inositol). A continuación, estos compuestos serán respectivamente designados en el texto por los acrónimos siguientes: IP1(1), IP1(3), IP1(4) e IP1(5) y tienen por fórmulas:



25 El IP1(1) y el IP1(4) son los intermediarios más estudiados.

Se describieron ya derivados del inositol-fosfato en los documentos de la técnica anterior siguientes:

- Essen *et al.*, ACS SYMPOSIUM SERIES, WASHINGTON DC, US (1999), vol. 718, páginas 121-136;
- 30 - Cottaz *et al.*, JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1, CHEMICAL SOCIETY, LETCHWORTH, GB (1995), páginas 1673-1678;
- Berlin *et al.*, TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL (1991), vol. 47, n° 1, páginas 1-20;
- Krauter *et al.*, MOLECULAR PHARMACOLOGY (2001), 59 (5), páginas 1086-1093;
- 35 - Chen *et al.*, JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY (1998), 63 (19), páginas 6511-6522;
- Cobb *et al.*, TETRAHEDRON (1991), 47 (1), páginas 21-30;
- Falck *et al.*, TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, junio de 2000, vol. 41, n° 22, páginas 4271-4275;
- WO 01/85740 A;
- 40 - WO 03/087109 A;
- US 2004/106158 A1.

Ninguno de estos documentos describe o sugiere los análogos del IP1 de la presente invención tales como los definidos aquí a continuación.

45 Los receptores de siete dominios de transmembrana copulados a las proteínas G (GPCR, 7 TM) están implicados en numerosos procesos patológicos. Tienen especialmente como función transmitir las señales del medio extracelular hacia el medio intracelular a través de la membrana celular. Las moléculas que desempeñan un papel de mensajero en el organismo, tales como las hormonas, los factores de crecimiento, las citoquinas o también los neurotransmisores, se unirán a estos receptores y desencadenarán una cascada de acontecimientos en el interior

de la célula.

El estudio del comportamiento de estos receptores en presencia de compuestos susceptibles de ser utilizados como medicamentos es uno de los métodos de elección que permiten descubrir nuevos tratamientos. Una de las vías ampliamente utilizada para estudiar la activación o la desactivación de estos receptores consiste en medir las variaciones de concentración de los mensajeros intracelulares durante la unión de medicamentos potenciales a estos receptores. Las herramientas que permiten medir las variaciones de estos mensajeros intracelulares son, pues, muy preciadas en la investigación farmacéutica, pero también en los trabajos de investigación fundamental destinados a comprender mejor los mecanismos de señalización inter/intracelular.

La unión de un ligando agonista a un receptor 7TM modificará la estructura terciaria del receptor, lo que induce a su vez una modificación de la conformación de una proteína G copulada al receptor. La activación de esta proteína G provocará a su vez, según los casos, o bien la activación, o bien la inhibición, de un efector, lo que producirá un segundo mensajero intracelular, como el AMPc o el IP₃.

Uno de estos efectores es la fosfolipasa C (PLC), que induce la hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) de la membrana a diacilglicerol (DAG) y a trifosfato de inositol (IP₃). El IP₃ a su vez provoca un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular por la activación de receptores del IP₃ presentes en el retículo endoplásmico. Este IP₃ tiene un tiempo de vida media muy rápido (menos de un minuto), ya que, o bien se fosforila inmediatamente en su posición 3 para dar el 1,3,4,5-tetrakisfosfato de inositol (IP₄), o bien se degrada en IP₂ por una fosfatasa específica. El IP₄ y el IP₂ se degradan entonces rápidamente por una serie de enzimas (5-, 3-, 4- o 1-PPASE), para dar mayoritariamente IP₁(1) e IP₁(4), pero también IP₁(3) e IP₁(5). Estos monofosfatos de inositol tienden a acumularse antes de degradarse en inositol por la acción de la inositol monofosfatasa (IMPasa). Esta última degradación puede ser artificialmente ralentizada por la utilización de sales de litio inhibitoras de la IMPasa [Parthasarathy *et al.* Life Sci. (1994), 54, 1127-1142], lo que permite una acumulación de IP₁ en la célula y facilita la titulación eventual de este intermediario. El conjunto de las transformaciones de estos derivados del inositol se denomina ciclo del inositol. El IP₁ producido por la activación del ciclo del inositol es uno de estos mensajeros intracelulares y su titulación permite detectar la modulación de la vía de señalización que implica a la fosfolipasa C.

Las titulaciones de IP₁ descritas en la literatura están principalmente basadas en métodos radioisotópicos [Berridge *et al.* Biochem J. (1983) 212, 473-82]. Se incuban células en presencia de inositol tritiado (48 h) y de cloruro de litio para evitar la degradación enzimática del IP₁ formado. Se tratan las células con un agente estimulante de los receptores de membrana (neuromediador agonista) y se lisan luego, y se deposita el inositol, así como el conjunto de los fosfatos de inositol (IP₃, IP₂, IP₄, IP₁) de la fracción citosólica, sobre una columna intercambiadora de aniones y se eluye esta columna con un gradiente de formiato de amonio; se recoge el IP₁ marcado con tritio a una fuerza iónica dada y la radiactividad medida permite así estimar la cantidad de IP₁ formada por la estimulación de las células. Esta técnica, bastante difícil de controlar, tiene el inconveniente de utilizar radioisótopos y no permite una cuantificación absoluta del IP₁ formado; además, este método no permite un gran número de titulaciones simultáneas. No obstante, se ha podido miniaturizar [Chengalvala *et al.* J. Biochem. Biophys. Methods (1999), 38, 163-170] para responder parcialmente a las necesidades, tales como el cribado de alto rendimiento de moléculas.

Se han propuesto otras técnicas que utilizan los inositidos tritiados [Zheng W *et al.* J. Biomol. Screen. (2004) 9 (2): 132-40], [Brandish P.E. *et al.* Anal. Biochem. (2003) 313, 311-318] y [Liu JJ *et al.* Anal. Biochem., 1 de Julio de 2003; 318 (1): 91-9]; la diferencia con la técnica isotópica anterior reside esencialmente a nivel de la medición. En estas técnicas, se utiliza una prueba de escintigrafía de proximidad, conocida bajo la denominación inglesa «Scintillation Proximity assay» (SPA), que pone en juego una fase sólida recubierta de un complejo metálico que posee una afinidad por los grupos fosfato [Liu *et al.* Anal. Biochem. (2003)]. En este caso, todos los intermediarios fosforilados (IP₁, IP₂, IP₃, etc.) son titulados conjuntamente y la selectividad no es posible más que entre el inositol y los fosfatos de inositol. Esta técnica está mejor adaptada al cribado de alto rendimiento y permite realizar numerosas titulaciones simultáneas, pero muy evidentemente carece de selectividad y no permite titular el IP₁ solo.

Para poder realizar una titulación no radiactiva del IP₁, se ha de disponer de un análogo funcionalizado del IP₁ de estereoquímica definida. Como el *mio*-inositol es una molécula que posee un plano de simetría, éste no es, por lo tanto, ópticamente activo (compuesto llamado "meso" cuya actividad óptica es destruida por la existencia de una simetría) y su fosforilación puede dar lugar, por ejemplo, a dos enantiómeros posibles, que son el D-*mio*-inositol-1-fosfato y el L-*mio*-inositol-1-fosfato, produciéndose el enantiómero D en la célula por el ciclo del inositol. Los derivados del IP₃ descritos en la literatura [Prestwich *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. (1991)] están funcionalizados sobre el fosfato en posición 1; por ello, están poco adaptados para generar anticuerpos específicos del IP₁.

Los inventores han desarrollado derivados del IP₁ que permiten superar los obstáculos e inconvenientes encontrados durante la realización de los métodos de titulación del IP₁ de la técnica anterior.

Descripción de la invención

5 La invención proporciona análogos funcionales del IP1(1), IP1(3), IP1(4) e IP1(5), substituidos por un grupo de reacción G o una sustancia o molécula conjugada M, estando unido dicho grupo de reacción G o sustancia o molécula M al IP1 por medio de un grupo de unión L. Los compuestos según la invención son análogos funcionales del IP1 en la medida en que poseen las mismas propiedades biológicas que este último, pero tienen además la ventaja de poder conjugarse a una molécula o sustancia.

10 La invención proporciona, en particular, derivados del IP1, ventajosamente substituidos en cualquiera de los carbonos del anillo de inositol que no lleve el grupo fosfato por uno o dos grupos de reacción G, o bien por una o dos sustancias o moléculas M, estando dichos grupos de reacción, sustancias o moléculas eventualmente unidos al IP1 por medio de un grupo de unión L.

15 La sustancia o molécula M, conjugada con un derivado del IP1 de la invención substituido por un grupo de reacción G, puede ser un marcador que permita detectar el IP1 en un medio de medición complejo. Estos marcadores pueden ser, por ejemplo, radioisótopos, compuestos fluorescentes o luminiscentes o también enzimas cuya actividad en presencia de su sustrato sea fácilmente medible. La sustancia o molécula M puede igualmente ser un marcaje (comúnmente denominado en lengua inglesa TAG), que será, por ejemplo, reconocido por un anticuerpo específicamente dirigido contra este marcaje.

20 Los derivados según la invención pueden estar por otra parte unidos a un soporte sólido, y ello de manera covalente a nivel de un carbono del anillo de inositol que no lleve el grupo fosfato.

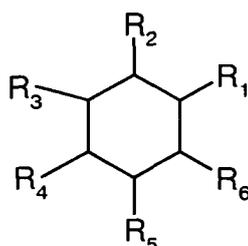
25 La invención proporciona también derivados del IP1 inmunógenos, que permiten fabricar anticuerpos específicos para el IP1. Estos inmunógenos están constituidos por los análogos según la invención unidos covalentemente a nivel de un carbono del anillo de inositol que no lleva el grupo fosfato a una molécula portadora.

30 La invención proporciona además ligandos que reconocen de manera específica el IP1, y en particular anticuerpos específicos para el IP1, llamados anticuerpos anti-IP1.

La invención proporciona, por otra parte, métodos de detección del IP1, utilizando estos métodos los análogos del IP1 según la invención o los ligandos específicos del IP1 según la invención, así como kits que contienen los elementos necesarios para la realización de estos procedimientos.

35 Finalmente, la invención proporciona procedimientos de síntesis de análogos del IP1.

Los análogos funcionales del IP1 según la invención tienen como fórmula general:



40 en la cual:

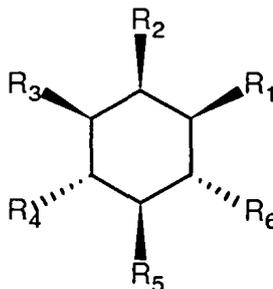
45 los substituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son seleccionados entre: $-OH$, $-OPO_3^{2-}$, $-OPO(OH)_2$ u $OPO(OH)O^-$, $-(OCONH)_q-L-G$ u $-(OCONH)_q-L-M$, a condición de que uno de los substituyentes R_1 a R_6 sea un grupo $-OPO_3^{2-}$, $-OPO(OH)_2$ u $OPO(OH)O^-$ y uno de los otros substituyentes R_1 a R_6 sea uno de los grupos $-(OCONH)_q-L-G$ u $-(OCONH)_q-L-M$, siendo los otros substituyentes R_1 a R_6 grupos $-OH$;
donde:

50 q es igual a 1,
L es un grupo de unión,
G es un grupo de reacción y
M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un inmunógeno, un soporte sólido o un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre

los miembros de los pares siguientes:

5 avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo, como por ejemplo 6HIS/anticuerpo anti-6HIS, FLAG/anticuerpo anti-FLAG, DNP/anticuerpo anti-DNP, GST/anticuerpo anti-GST, Cmyc/anticuerpo anti-Cmyc y HA/anticuerpo anti-HA, y oligonucleótido de una sola hebra/oligonucleótido de una sola hebra complementario.

Las familias preferidas de compuestos según la invención son derivados del *mio*-inositol de fórmula (II):



10 **(II) Derivados del *mio*-inositol**

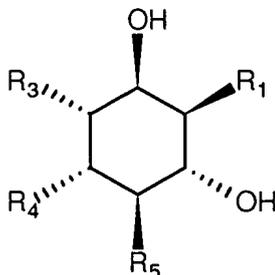
en la cual:

15 uno de los sustituyentes R₁, R₃, R₄ o R₅ es seleccionado entre los grupos -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻,
 uno de los otros sustituyentes R₁-R₆ es seleccionado entre los grupos -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M y los otros sustituyentes son grupos OH,
 donde:

20 q es igual a 1,
 L es un grupo de unión,
 G es un grupo de reacción y
 M es una substancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un
 25 inmunógeno, un soporte sólido o un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre los miembros de los pares antes definidos para los compuestos de fórmula (I).

30 La invención se relaciona igualmente con los derivados del *quiro*-, *neo*-, *escilo*- y *epi*-inositol, que tienen la misma estereoquímica que los derivados de *mio*-inositol, salvo en los carbonos que llevan los sustituyentes (CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M.

Los derivados de *quiro*-inositol según la invención llevan un grupo fosfato en posición 1, 4 ó 5 y están funcionalizados en posición 3. Estos derivados responden a la fórmula (III):



35 **(III) Derivados del *quiro*-inositol**

en la cual:

40 uno de los sustituyentes R₁, R₄ y R₅ es seleccionado entre: -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻,
 R₃ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M y los otros sustituyentes R₁, R₄ y R₅ son grupos -OH,
 donde:

q es igual a 1,

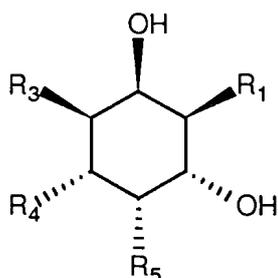
L es un grupo de unión,

G es un grupo de reacción y

5 M es una substancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un inmunógeno, un soporte sólido o un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre los miembros de los pares definidos anteriormente para los compuestos de fórmula (I).

Los derivados del *neo*-inositol según la invención llevan un grupo fosfato en posición 1, 3 ó 5 y están funcionalizados en posición 4. Estos derivados responden a la fórmula (IV):

10



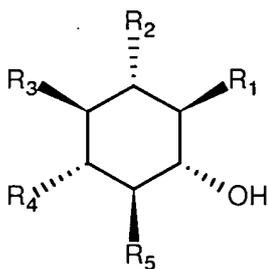
(IV) Derivados del *neo*-inositol

en la cual:

15 uno de los sustituyentes R₁, R₃ y R₄ es seleccionado entre: -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻, R₅ es seleccionado entre: -(OCONH)_q-L-G u -(OCONH)_q-L-M y los otros dos sustituyentes R₁, R₃ y R₄ son grupos -OH, donde:

20 q es igual a 1,
L es un grupo de unión,
G es un grupo de reacción y
M es una substancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un inmunógeno, un soporte sólido y un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre
25 los miembros de los pares definidos anteriormente para los compuestos de fórmula (I).

Los derivados del *escilo*-inositol según la invención llevan un grupo fosfato en posición 1, 3, 4 ó 5 y están funcionalizados en posición 2. Estos derivados responden a la fórmula (V):



30 **(V) Derivados del *escilo*-inositol**

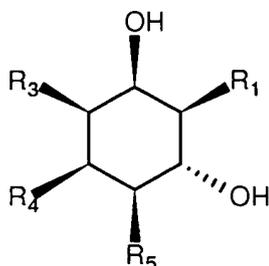
en la cual:

35 uno de los sustituyentes R₁, R₃, R₄ y R₅ es seleccionado entre: -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻, R₂ es seleccionado entre: -(OCONH)_q-L-G u -(OCONH)_q-L-M y los otros sustituyentes R₁, R₃, R₄ y R₅ son grupos -OH; donde:

40 q es igual a 1,
L es un grupo de unión,
G es un grupo de reacción y
M es una substancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un

inmunógeno, un soporte sólido y un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre los miembros de los pares definidos anteriormente para los compuestos de fórmula (I).

Finalmente, los derivados del *epi*-inositol según la invención llevan un grupo fosfato en posición 1, 3 ó 5 y están funcionalizados en posición 4. Estos derivados responden a la fórmula (VI):



(VI) Derivados del *epi*-inositol

en la cual:

- 10 uno de los sustituyentes R_1 , R_3 y R_5 es seleccionado entre: $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$,
 R_4 es seleccionado entre: $-(\text{CONH})_q\text{-L-G}$ u $-(\text{CONH})_q\text{-L-M}$ y
 los otros sustituyentes R_1 , R_3 y R_5 son grupos OH,
 15 donde:
 q es igual a 1,
 L es un grupo de unión,
 G es un grupo de reacción y
 20 M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un
 inmunógeno, un soporte sólido y un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre
 los miembros de los pares definidos anteriormente para los compuestos de fórmula (I).

Los compuestos de las fórmulas (I) a (IV) según la invención en los cuales uno de los sustituyentes es un grupo fosfato $-\text{OPO}_3^{2-}$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$ están eventualmente neutralizados por un catión Z monovalente o divalente cualquiera.

Son ejemplos de cationes apropiados para los fines de la invención los cationes Li^+ , Na^+ , K^+ , $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{NH}^+$, $(\text{C}_6\text{H}_{11})\text{-NH}_3^+$, Ca_2^+ y Ce_2^+ .

30 Una familia de compuestos preferidos según la invención está constituida por los compuestos de las fórmulas (I) a (VI) en las cuales R_1 es seleccionado entre los grupos $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$.

Otra familia de compuestos preferidos según la invención está constituida por los compuestos de las fórmulas (I) a (V) en las cuales R_4 es seleccionado entre los grupos $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$.

35 Entre los compuestos de las fórmulas (I) a (VI), se prefieren muy en particular:

- 1) los compuestos de fórmula (I) en la cual:
 - 40 - R_1 es un grupo $-\text{OPO}_3\text{Z}_2$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{OZ}$;
 - R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son seleccionados entre: $-\text{OH}$, $-(\text{CONH})_q\text{-L-G}$ u $-(\text{CONH})_q\text{-L-M}$, siendo cuatro de los sustituyentes R_2 a R_6 grupos OH;
- 2) los compuestos de fórmula (II) en la cual:
 - 45 - R_1 es un grupo $-\text{OPO}_3\text{Z}_2$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{OZ}$;
 - R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son seleccionados entre: $-\text{OH}$, $-(\text{CONH})_q\text{-L-G}$ u $-(\text{CONH})_q\text{-L-M}$, siendo cuatro de los sustituyentes R_2 a R_6 grupos OH;
- 50 3) los compuestos de fórmula (III) en la cual:
 - R_1 es un grupo $-\text{OPO}_3\text{Z}_2$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{OZ}$;
 - R_3 es seleccionado entre: $-(\text{CONH})_q\text{-L-G}$ u $-(\text{CONH})_q\text{-L-M}$;

4) los compuestos de fórmula (IV) en la cual:

- R₁ es un grupo -OPO₃Z₂, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)OZ;
- R₅ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M;

5) los compuestos de fórmula (V) en la cual:

- R₁ es un grupo -OPO₃Z₂, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)OZ;
- R₂ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M;

6) los compuestos de fórmula (VI) en la cual:

- R₁ es un grupo -OPO₃Z₂, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)OZ;
- R₄ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M.

En cada una de las definiciones anteriores, L, M y q son tal como se ha definido anteriormente para los compuestos de fórmula (I) y Z es un catión seleccionado entre Li⁺, Na⁺, K⁺, (CH₃CH₂)₃NH⁺ y (C₆H₁₁)-NH₃⁺.

Se pueden unir los análogos de IP1 que contienen un grupo de reacción G a numerosas moléculas orgánicas o inorgánicas que contengan de forma natural, o en las que se hayan introducido, grupos funcionales susceptibles de reaccionar con el grupo de reacción G, para permitir de este modo la unión covalente de la sustancia o molécula M al IP1, eventualmente a través del grupo de unión L.

1. Grupo de reacción G:

Por grupo de reacción G, se entiende un grupo capaz de reaccionar con un grupo funcional presente en otra sustancia o molécula para formar una unión covalente. En este caso, el grupo de reacción G reaccionará con un grupo funcional presente en la sustancia o la molécula que se desea conjugar al IP1.

Típicamente, el grupo de reacción es un grupo electrófilo o nucleófilo que puede formar una unión covalente cuando se le pone en presencia de un grupo nucleófilo o electrófilo apropiado, respectivamente. La reacción de conjugación entre el análogo de IP1 y la sustancia o molécula que se ha de conjugar M conlleva la formación de una unión covalente que lleva uno o más átomos del grupo de reacción. A modo de ejemplos, a continuación se da una lista de los pares de grupos electrófilos/nucleófilos y el tipo de unión covalente formada cuando se ponen en presencia entre sí:

Grupo electrófilo	Grupo nucleófilo	Tipo de unión
acrilamidas	tioles	tioéteres
haluros de acilo	aminas/anilinas	carboxamidas
aldehídos	aminas/anilinas	iminas
aldehídos o cetonas	hidrazinas	hidrazonas
aldehídos o cetonas	hidroxilaminas	oximas
alquilsulfonatos	tioles	tioéteres
anhídridos	aminas/anilinas	carboxamidas
haluro de arilo	tioles	tiofenoles
haluro de arilo	aminas	arilaminas
aziridinas	tioles	tioéteres
carbodiimidias	ácidos carboxílicos	N-acilureas o anhídridos
ésteres activados*	aminas/anilinas	carboxamidas
haloacetamidas	tioles	tioéteres
halotriazinas	aminas/anilinas	aminotriazinas
imidoésteres	aminas/anilinas	amidinas
isocianatos	aminas/anilinas	ureas
isotiocianatos	aminas/anilinas	tioureas
maleimidias	tioles	tioéteres
ésteres sulfonato	aminas/anilinas	alquilaminas
haluros de sulfonilo	aminas/anilinas	sulfonamidas

*: por éster activado, se entienden grupos de fórmula COY, donde Y es:

- un grupo saliente seleccionado entre los grupos succinimidiloxi (-C₄H₄NO₂) o sulfosuccinimidiloxi (-C₄H₃O₂-SO₃H);
- un grupo ariloxi substituido o no por al menos un substituyente electroatrayente, tal como los grupos nitro, fluoro, cloro, ciano o trifluorometilo, para formar así un éster de arilo activado;
- un ácido carboxílico activado por un grupo carbodiimida, para formar así un anhídrido mixto -OCOR_a u

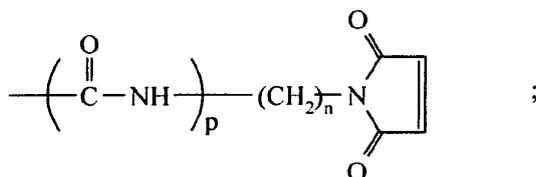
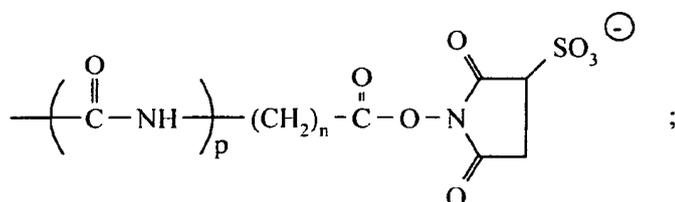
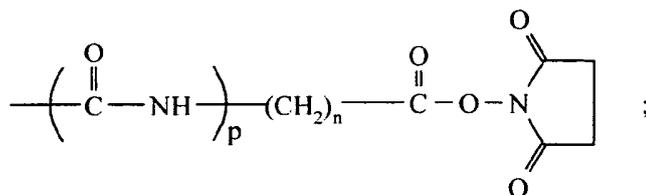
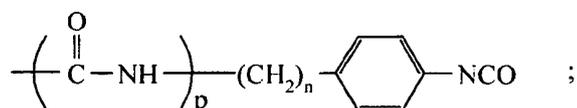
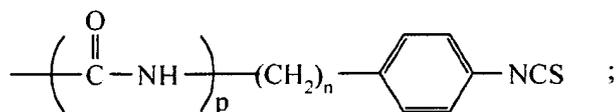
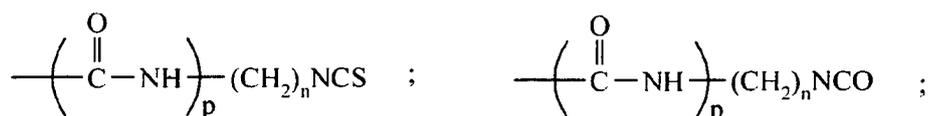
-OCNR_aNHR_b, donde R_a y R_b son idénticos o diferentes y son seleccionados entre los grupos alquilo C₁-C₆, perfluoroalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ o ciclohexilo;
 • 3-dimetilaminopropilo o N-morfolinoetilo.

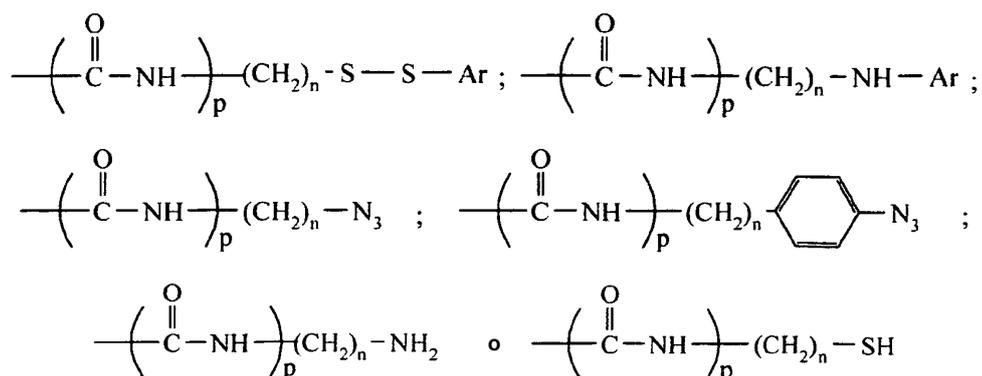
A modo de ejemplo no limitativo, la sustancia o molécula que se ha de conjugar M comprende al menos uno de los grupos funcionales siguientes, con el cual reaccionará el grupo de reacción G: aminas, amidas, tioles, aldehídos, cetonas, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas secundarias, haluros, epóxidos, ésteres de carboxilato, ácidos carboxílicos, dobles enlaces o una combinación de estos grupos funcionales.

El grupo funcional llevado por la molécula M que reaccionará con el grupo de reacción G será, por ejemplo, un grupo amina, tiol, alcohol, aldehído o cetona. Preferiblemente, el grupo de reacción G reaccionará con un grupo funcional amina o tiol.

Se describen métodos de introducción de estos grupos funcionales especialmente en C. Kessler, Nonisotopic probing, Blotting and Sequencing, 2nd edition, L.J. Kricka (1995), Ed. Academic Press Ltd., Londres, pp. 66-72.

Preferentemente, el grupo de reacción G es un grupo derivado de uno de los compuestos siguientes: una acrilamida, una amina activada (por ejemplo una cadaverina o una etilendiamina), un éster activado, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, una anilina, una azida, una aziridina, un ácido carboxílico, un diazoalcano, una haloacetamida, una halotriazina, tal como la monoclorotriazina o la diclorotriazina, una hidrazina (incluyendo las hidrazidas), un imidoéster, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un haluro de sulfonilo o un tiol, una cetona, una amina, un haluro de ácido, un éster de hidroxisuccinimidilo, un éster de hidroxisulfosuccinimidilo, un azidonitrofenilo, un azidofenilo, una 3-(2-piridilditio)propionamida o glioxal, y en particular los grupos de fórmula:





5 donde n varía de 0 a 8 y p es igual a 0 ó 1, y Ar es un heterociclo de 5 ó 6 eslabones que tiene de 1 a 3 heteroátomos, eventualmente substituido por un átomo de halógeno.

10 Preferiblemente, el grupo de reacción G es un ácido carboxílico, un éster de succinimido de ácido carboxílico, una haloacetamida, una hidrazina, un isotiocianato, un grupo maleimida o una amina alifática.

2. Grupo de unión L:

15 El grupo de unión L que une el grupo de reacción G o la sustancia o molécula conjugada M al IP1 puede ser un enlace covalente sencillo o un brazo de espaciamiento que tenga de 1 a 20 átomos diferentes de hidrógeno, seleccionados entre los átomos de carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre, siendo este grupo de unión lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, y estando constituido por una combinación de enlaces seleccionados entre: los enlaces carbono-carbono, que pueden ser sencillos, dobles, triples o aromáticos, los

20 enlaces carbono-nitrógeno, los enlaces nitrógeno-nitrógeno, los enlaces carbono-oxígeno, los enlaces carbono-azufre, los enlaces fósforo-oxígeno, los enlaces fósforo-nitrógeno, los enlaces éter, los enlaces éster, los enlaces tioéter, los enlaces amina, los enlaces amida, los enlaces carboxamida, los enlaces sulfonamida, los enlaces urea, los enlaces uretano, los enlaces hidrazina y los enlaces carbamoilo.

25 Preferentemente, el grupo de unión L tiene de 1 a 20 átomos diferentes del hidrógeno y seleccionados entre C, N, O, P y S, y puede incluir combinaciones de enlaces éter, tioéter, carboxamida, sulfonamida, hidrazina, amina y éster y enlaces aromáticos o heteroaromáticos.

30 Preferiblemente, L está constituido por una combinación de enlaces sencillos carbono-carbono y de enlaces carboxamida o tioéter.

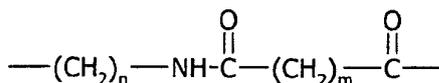
A modo de ejemplo, L puede ser seleccionado entre las cadenas siguientes: polimetileno, arileno, alquilarileno, arilenoalquilo o ariltío.

35 Según un aspecto ventajoso, el grupo de unión L está constituido por un radical orgánico bivalente, seleccionado entre los grupos alquileo lineales o ramificados C₁-C₂₀, que contienen eventualmente uno o más dobles enlaces o triples enlaces y/o que contienen eventualmente uno o más heteroátomos, tales como el oxígeno, el nitrógeno, el azufre o el fósforo, o uno o más grupos carbamoilo o carboxamido; los grupos cicloalquileo C₅-C₈, y los grupos arileno C₆-C₁₄, estando dichos grupos alquileo, cicloalquileo o arileno eventualmente substituidos por grupos

40 alquilo, arilo o sulfonato.

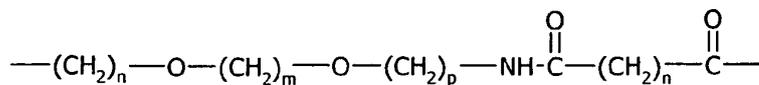
En particular, el grupo de unión L es seleccionado entre los grupos:

45 1) -(CH₂)_n-
2)



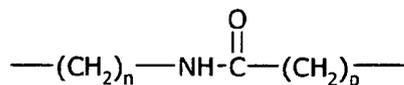
50 3) -(CH₂)_n-O-(CH₂)_m-O-(CH₂)_p-

4)



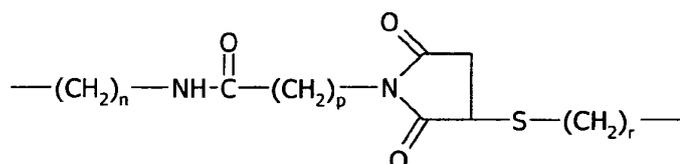
5

5)

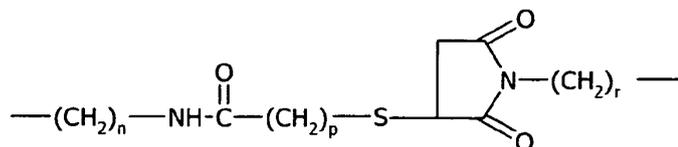


10

6)

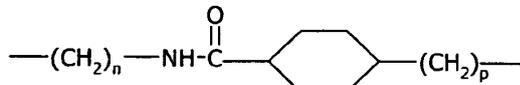


7)



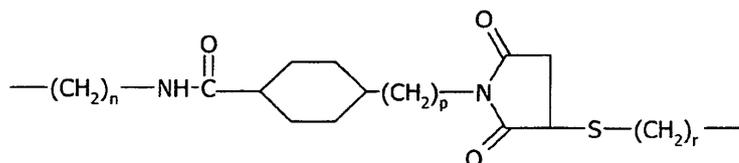
15

8)



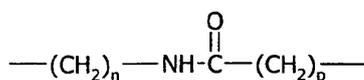
20

9)



25

10) $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}$
11)



30

12) $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_p\text{---}$
en las cuales:

- n y m son números enteros de 2 a 16, preferentemente de 2 a 8;
- p y r son números enteros de 1 a 16, preferentemente de 1 a 5.

35

Los grupos de unión L 1) a 5), 7) y 10) a 12) son particularmente apropiados cuando el grupo funcional que permite conectar el grupo de unión sobre la molécula análoga de IP1 es un grupo carbamoilo o éter y el grupo funcional sobre la sustancia o molécula M es un grupo amida.

40

Los grupos de unión L 6) y 9) son particularmente apropiados cuando el grupo funcional que permite conectar el grupo de unión sobre la molécula análoga de IP1 es un grupo carbamoilo o éter y el grupo funcional sobre la

substancia o molécula M es un grupo amida o tioéter.

3. Procedimiento de síntesis:

5 Los procedimientos de síntesis de los análogos de la invención están representados en las Figuras 1 a 9 adjuntas a la presente descripción y son explicitados a continuación.

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol (compuesto 1) que llevan un grupo de reacción G en posición 2 ó 3 (Figura 1).

10 La presente invención se relaciona igualmente con un procedimiento de síntesis de análogos de IP1 a partir de *mio*-inositol (compuesto 1) que comprende las etapas siguientes:

(i) Protección de las funciones diol en posición *cis* por un grupo protector:

15 Se pueden proteger las funciones diol adyacentes y en configuración *cis* mediante un derivado acetal de una cetona ópticamente activa, como el D-alcanfordimetilacetal.

20 Al llevar el inositol 2 dioles en posiciones *cis*, la reacción del inositol con el grupo protector dará lugar a la formación de dos diastereoisómeros, que pueden separarse por las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia.

(ii) Fosforilación:

25 Se fosforila entonces el *mio*-inositol cuyas funciones diol *cis* están protegidas (compuesto 2) en las condiciones habituales conocidas por el experto en la materia. Preferiblemente, se utiliza para ello fosforoclorhidrato de dibencilo en las condiciones descritas en los ejemplos que se dan a continuación.

(iii) Protección de las funciones hidroxilo:

30 Las funciones hidroxilo del inositol y las del grupo fosfato pueden ser protegidas por los grupos protectores clásicos habitualmente utilizados en el campo de la química orgánica de síntesis. A este efecto, se podrá recurrir a la obra de Green [Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, N.Y. (1981)].

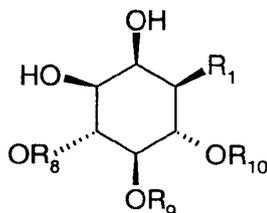
35 Los residuos de ésteres, tales como el pivaloilo, el benzoilo, el cloroacetilo, el fenilacetilo o el benciloxycarbonilo, los residuos de silil éteres, tales como el trimetilsililoxi, el trietilsililoxi, el terc-butildimetilsililoxi o el terc-butildifenilsililoxi, el benciloxi, el p-metoxibenciloxi, el 3,4-dimetoxibenciloxi, los aliloxi o los aliloxicarboxi.

Preferiblemente, el grupo protector es un grupo fenilmetiloxicarbonilo (=benciloxicarbonilo).

40 (iv) Desprotección selectiva de las funciones hidroxilo en las posiciones 2-3

45 Se desprotegen las funciones hidroxilo en las posiciones 2-3 protegidas en la etapa 1 utilizando los reactivos de desprotección clásicos conocidos por el experto en la materia. A modo de ejemplo, en caso de que el reactivo de protección utilizado sea el D-alcanfordimetilacetal, se puede hacer que el compuesto obtenido en la etapa precedente reaccione con una mezcla TFA/H₂O (ácido trifluoroacético).

Esta etapa permite obtener el intermediario de fórmula:



50 en la cual:

55 R₁ es un grupo -OPO(OR₇)₂ y R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son idénticos o diferentes y representan un grupo protector de las funciones hidroxilo tal como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, R₈, R₉ y R₁₀ son idénticos y representan el grupo benciloxicarbonilo y R₇ es el grupo bencilo (Bn),

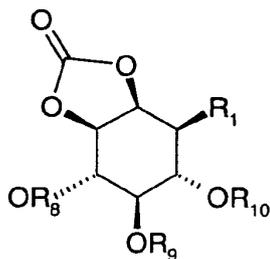
o bien los dos grupos R_7 forman juntos un grupo xilileno.

Estos intermediarios pueden ser ventajosamente utilizados para producir los análogos de IP1 de la invención.

5 (v) Formación de un carboxilato cíclico

Con el fin de poder injertar el grupo L-G sobre el compuesto obtenido en la etapa anterior, se introduce una función carboxilato cíclico a nivel de los carbonos en las posiciones 2-3 del inositol. A modo de ejemplo, esta función puede ser generada haciendo reaccionar el compuesto obtenido en la etapa anterior con un fosgeno en las condiciones descritas en los ejemplos que se darán a continuación.

El compuesto obtenido tiene como fórmula:



15 en la cual:

R_1 es un grupo $-OPO(OR_7)_2$ y

20 R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} son idénticos o diferentes y representan un grupo protector de las funciones hidroxilo tal como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, R_8 , R_9 y R_{10} son idénticos y representan el grupo benciloxicarbonilo y R_7 es el grupo bencilo (Bn), o bien los dos grupos R_7 forman juntos un grupo xilileno.

25 (vi) Desprotección de las funciones hidroxilo protegidas en la etapa (iii)

Se lleva a cabo esta etapa según los procedimientos clásicos bien conocidos por el experto en la materia y se ilustra en los ejemplos que se darán a continuación.

30 (vii) Apertura del carboxilato cíclico e introducción del grupo L-G

Se lleva a cabo esta etapa según los procedimientos clásicos bien conocidos por el experto en la materia y se ilustra en los ejemplos que se darán a continuación.

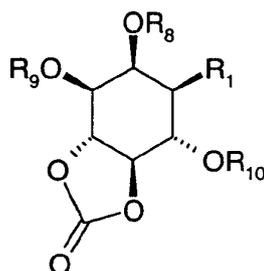
35 Las etapas esenciales de este procedimiento son, pues:

- (i) Protección de las funciones diol en posición *cis* por un grupo protector.
- (ii) Fosforilación.
- (iii) Protección de las funciones hidroxilo.
- 40 (iv) Desprotección selectiva de las funciones hidroxilo en las posiciones 2-3.
- (v) Formación de un carboxilato cíclico.
- (vi) Desprotección de las funciones hidroxilo protegidas en la etapa (iii).
- (vii) Apertura del carboxilato cíclico e introducción del grupo L-G tal como se ha definido anteriormente.

45 Este procedimiento general está ilustrado en los ejemplos 1 a 10 más adelante.

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-1-P que llevan un grupo de reacción G en posición 4 y 5 (Figura 2):

50 Este procedimiento se basa en la utilización de intermediarios de síntesis de fórmula general:



en la cual:

- 5 R₁ es un grupo -OPO(OR₇)₂ y
 R₇, R₈, R₉ y R₁₀ son idénticos o diferentes y representan un grupo protector de las funciones hidroxilo tal
 como se ha definido anteriormente.

10 Preferentemente, R₈, R₉ y R₁₀ son idénticos y representan el grupo benciloxicarbonilo y R₇ es el grupo bencilo (Bn),
 o bien los dos grupos R₇ forman juntos un grupo xilileno.

15 Se trata el derivado (compuesto 14) preparado según un procedimiento descrito en la literatura (Gigg, J. *et al.* Chem.
 Soc. Perkin trans I, 1987, 423) con fosgeno en piridina para obtener el carbonato cíclico correspondiente (compuesto
 15). Se puede realizar la fosforilación del 1,3,4-tri-O-bencil-*mio*-inositol-4,5-O-carbonato cíclico mediante tratamiento
 con oxiclورو de fósforo, con dibencilfosforocloridita o con di-O-bencil-N,N-diisopropilfosforamidita (en este caso, se
 oxida el fosfito intermediario obtenido a fosfato con ayuda de un peróxido, de yodo o de peryodato de sodio). Sea
 cual sea el procedimiento de fosforilación utilizado, se somete el derivado protegido del *mio*-inositol-1-fosfato
 (compuesto 16) así obtenido a una hidrogenación catalítica (paladio sobre carbón), para obtener el derivado del *mio*-
 inositol-1-fosfato (compuesto 17), que posee un carbonato cíclico en 4,5 que representa el intermediario clave de
 esta ruta de síntesis. Se obtiene el 4-O-(5-aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato por apertura del carbonato
 cíclico con ayuda de un derivado monobenciloxicarbonilado de una diamina, seguida de una hidrogenación
 catalítica; se obtiene una mezcla de los dos regioisómeros portadores del brazo de aminopentilcarbamoilo, ya sea
 en posición 4 (compuesto 18), ya sea en posición 5 (compuesto 19), y se separan luego estos dos isómeros por
 HPLC en fase invertida utilizando un gradiente de acetonitrilo en una solución acuosa de acetato de trietilamonio.

25 Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-1-P que llevan un grupo de reacción G en posición 4 (Figura
 3):

30 Se trata el derivado 2,3:5,6-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol (compuesto 20) preparado según un procedimiento
 descrito en la literatura (Watanabe *et al.* Tetr. Lett. 1993, 34, 497) con fosfito de tribencilo en presencia de
 perbromuro de piridinio y de trietilamina en diclorometano para obtener mayoritariamente el derivado 1-
 (dibencilfosfato) (compuesto 21) según el protocolo de fosforilación descrito por Watanabe (véase lo anterior); se
 separa el compuesto deseado de los subproductos, tales como el isómero fosforilado C-4 minoritario, por
 cromatografía en sílice. Se trata entonces el derivado fosforilado con carbonildiimidazol en dimetilformamida, no se
 aisla el derivado imidazolilo intermediario y se trata el producto, siempre en solución en DMF, con un exceso (5
 equivalentes) de un derivado monobenciloxicarbonilado de una diamina. Se trata el análogo del inositol-1-fosfato
 portador de una cadena de aminopentilcarbamoilo en posición 4 así obtenido en forma protegida (compuesto 23) R₂
 = benciloxicarbonilo sucesivamente en medio ácido para hidrolizar los grupos protectores ciclohexilideno y se le
 somete luego a una hidrogenación catalítica para obtener la forma «desprotegida» (R₂ = H) del análogo del inositol-
 1-fosfato buscado que lleva una cadena de aminopentilcarbamoilo en posición 4 (compuesto 24).

 Procedimiento de síntesis de análogos del *quiro*-inositol-1-P que llevan un grupo de reacción G en posición 6 (Figura
 4):

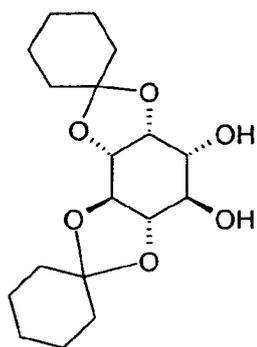
45 Se oxida el derivado 1-O-alil-2,3,4-tri-O-bencil-5-O-(p-metoxibencil)-D-*quiro*-inositol (el producto puede ser también
 denominado 2-O-alil-3,4,5-tri-O-bencil-6-O-(4-metoxibencil)-D-*quiro*-inositol (compuesto 25) para mostrar su
 parentesco estructural con el *mio*-inositol-1-fosfato; esta numeración es utilizada en la Figura 4 y la descripción
 siguiente), preparado según un procedimiento descrito en la literatura (Jaramillo, C. *et al.*, J. Org. Chem. 1994, 59,
 3135), con clorocromato de piridinio para obtener la cetona correspondiente, que se purifica por cromatografía en gel
 de sílice. Se reduce la cetona de forma estereoselectiva por medio de un hidruro quiral. Se purifica el producto de la
 reducción por cromatografía en gel de sílice para separar el derivado *mio*-inositol buscado del subproducto de
 configuración *quiro*. Se fosforila el derivado 2-O-alil-3,4,5-tri-O-bencil-6-O-(4-metoxibencil)-D-*mio*-inositol (compuesto
 26) así obtenido con di-O-bencil-N,N-diisopropilfosforamidita en presencia de tetrazol; tras oxidación con peryodato
 de sodio, se extrae el producto y se purifica en gel de sílice. Se obtiene así el 2-O-alil-3,4,5-tri-O-bencil-1-O-
 (dibencilfosfono)-6-O-(p-metoxibencil)-D-*mio*-inositol (27), que es tratado con ácido trifluoroacético al 2% en

diclorometano, para obtener el 2-O-*alil*-3,4,5-tri-O-bencil-1-O-(dibencilfosfono)-D-*mio*-inositol (compuesto 28). Se trata entonces este compuesto con carbonildiimidazol en dimetilformamida, no se aísla el derivado imidazol intermediario y se trata el producto en solución en DMF con un exceso (5 equivalentes) de un derivado monobenciloxicarbonilado de una diamina. Se purifica el análogo del inositol-1-fosfato portador de una cadena de aminopentilcarbamóilo en posición 6 así obtenido en forma protegida ((compuesto 29), R₂ = benciloxicarbonilo) por cromatografía en gel de sílice y se le somete luego a una hidrogenación catalítica, para obtener la forma «desprotegida» ((compuesto 30), R₂ = H) del análogo del inositol-1-fosfato buscado portador de una cadena de aminopentilcarbamóilo en posición 6.

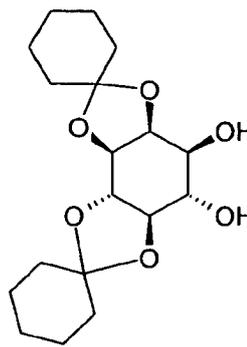
10 Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-1-P que llevan un grupo de reacción G en posición 4 ó 5 (Figura 6):

15 Se describen análogos del D-*mio*-inositol-1-fosfato [IP1(1)] que llevan un grupo de reacción G en posición 4 ó 5 (respectivamente, compuestos 18 y 19) en el esquema de síntesis (Figura 2) y en el texto anterior que hace referencia a la Figura 2; la ruta de síntesis parte del compuesto 14 preparado según un procedimiento descrito en la literatura a partir del *mio*-inositol comercial (Gigg, J. *et al.*, J. Chem. Soc. Perkin trans I, 1987, 423). Es posible preparar el derivado 14 en una forma enantioméricamente pura con el fin de obtener los derivados 18 y 19 en una forma enantioméricamente pura (18D y 19D) introduciendo una etapa de resolución óptica. Se propone una síntesis alternativa que permite obtener más fácilmente estos mismos compuestos 18D y 19D en una forma enantioméricamente pura utilizando una resolución enzimática. Se describe el esquema de síntesis en la Figura 6 partiendo del 2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol (compuesto 34), uno de los isómeros obtenido durante la protección del *mio*-inositol comercial por dos grupos ciclohexilideno según el protocolo de Garegg *et al.* (Carbohydr. Chem. 130, 1984, 322-326). En la Figura 6, se utiliza arbitrariamente el enantiómero de configuración D para designar el racemato, y, cuando se designa uno solo de los enantiómeros (por ejemplo, el de configuración D), se hace seguir el número del compuesto por la letra D.

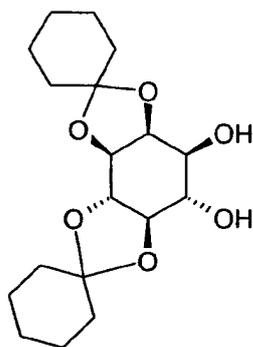
Así, por ejemplo, se representan el 2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol (racemato) (compuesto 34) y los enantiómeros L y D correspondientes (compuestos 34 L y 34 D) como sigue:



**2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-L-*myo*-inositol
compuesto 34L**



**2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-D-*myo*-inositol
compuesto 34D**



**2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*myo*-inositol (racemato)
compuesto 34**

Se trata el derivado 2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*myo*-inositol 34 en forma de racemato con óxido de dibutilestaño y luego con cloruro de n-butirilo, como describen Gou *et al.* (Carbohydr. Res. 234, 1992, 51-64). Contrariamente a lo que se describe en el artículo de Gou *et al.*, los datos de RMN (el protón H₁ resuena a 4,98 ppm para el compuesto 36 y a 3,89 para el 37, y el protón H₆ resuena a 4,09 ppm para el compuesto 36 y a 5,21 ppm para el compuesto 37) muestran que el isómero preponderante es el derivado que lleva el grupo butirilo en posición 1 (compuesto 36) y no el derivado que lleva el grupo butirilo en posición 6 (compuesto 37) como se describe en el artículo de Gou *et al.* (Carbohydr. Res. 234, 1992, 51-64).

Se somete el éster monobutírico 36 (racémico) a una etapa de resolución enzimática según el método descrito en la publicación de Gou *et al.* (Carbohydr. Res. 234, 1992, 51-64); la lipasa pancreática hidroliza selectivamente el isómero L para dar el 2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-L-*myo*-inositol (34L), dejando inalterado el isómero 36D (1-butiril-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-D-*myo*-inositol), lo que permite obtener el producto 36D en una forma enantioméricamente pura. Se saponifica el producto 36D, para obtener el diol 34D, que se trata con óxido de dibutilestaño y luego con bromuro de bencilo para obtener el derivado monobencilado 37D; se trata éste a continuación con o-xililen-N,N-diisopropilfosforamidita (preparada de forma análoga a la o-xililen-N,N-dietilfosforamidita (también denominada 1,5-dihidro-N,N-bis(1-metiletil)-2,4,3-benzodioxafepin-3-amina) según el protocolo de Watanabe *et al.*, Tetrahedron Letters, 1990, 31, 255-256), así como en los documentos siguientes: WO 9100258 A1 y Tetrahedron Letters, 1995, 36, 8023-8026), para obtener un fosfito intermediario inestable que se oxida *in situ* mediante hidróperóxido de terc-butilo, con lo que se obtiene el 6-O-bencil-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-5-O-(o-xililendioxifosforil)-D-*myo*-inositol 38D. Se retira selectivamente el grupo protector ciclohexilideno que bloquea los hidroxilos 4 y 5 del compuesto 38D mediante un tratamiento en medio ácido (transacetalación en presencia de etilenglicol), para obtener el diol 39D, que es luego tratado con 1,1'-carbonyldiimidazol para obtener el carbonato cíclico 40D. De manera análoga a lo que se describe en el ejemplo 7, se abre el carbonato cíclico 40D con un derivado monoprottegido (grupo protector Z = benciloxicarbonilo) de la pentilamina, para generar los dos isómeros de posición: 41D (isómero portador del brazo en

posición 4) y 42D (isómero portador del brazo en posición 5). Se desprotege entonces cada uno de los isómeros 41D y 42D para dar, respectivamente, el compuesto 18D análogo del D-*mio*-inositol-1-fosfato portador de un grupo de reacción en la posición 4 del anillo de inositol y el compuesto 19D análogo del D-*mio*-inositol-1-fosfato portador de un grupo de reacción en la posición 5 del anillo de inositol. El ejemplo 19 describe la síntesis de los compuestos 18D y 19D, que pueden ser utilizados de forma análoga a los compuestos 10 y 11 del ejemplo 8 (obsérvese que los compuestos 10 y 11 son enantioméricamente puros, ya que en la ruta de síntesis descrita en la Figura 1, interviniendo la resolución óptica desde la primera etapa, todos los derivados a partir del compuesto 2 son de la serie D y son ópticamente activos). De manera análoga a lo que se describe en el ejemplo 9 para el compuesto 10, los compuestos 18D y 19D pueden conjugarse a la biotina gracias al grupo de reacción que llevan, respectivamente, en la posición 4 y en la posición 5 del esqueleto del *mio*-inositol-1-fosfato; de este modo, los compuestos 18D y 19D se convierten, respectivamente, en sus conjugados biotinilados 43D y 44D.

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-4-fosfato que llevan un grupo de reacción G en posición 5 ó 6 (véase la Figura 7):

Una de las formas de monofosfato de inositol, aparte del D-*mio*-inositol-1-fosfato y susceptible de acumularse durante la activación del ciclo de los fosfatos de inositol, es el D-*mio*-inositol-4-fosfato (véase el artículo de Ragan *et al.*, Biochem J. (1988), 249 (1),143-148 concerniente a la formación del D-*mio*-inositol-4-fosfato y el artículo de Billington *et al.*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 (1989), 8, 1423-1429 concerniente a una nomenclatura abreviada de los diferentes derivados del *mio*-inositol presentes en las células); es, pues, ventajoso disponer de análogos del D-*mio*-inositol-4-fosfato portadores de un brazo de reacción en posición 1, 2, 5 ó 6. La Figura 7 muestra una ruta de síntesis del D-*mio*-inositol-4-fosfato portador de un brazo de reacción en posición 6. Se trata el 1,2:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol 20 (al que también se puede denominar 2,3:5,6-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol para mostrar su relación de estructura con el D-*mio*-inositol-4-fosfato, véase la Figura 3) en forma racémica preparado según el protocolo de Vacca *et al.*, con bromuro de bencilo con el fin de obtener el derivado monobencilado 45, como describen Vacca *et al.* [Vacca, J.P. Tetrahedron, 1989, 45 (17), 5679-5702]. Se trata el derivado 45 (racémico) con el cloruro del ácido S(-)-canfánico para obtener la mezcla de los dos diastereómeros (canfanato) 46D y 46L y se aísla el compuesto 46D (el más polar) por cristalización y recristalización [Vacca, J.P. Tetrahedron, 1989, 45 (17), 5679-5702]. Se saponifica el compuesto 46D con hidróxido de potasio en etanol, para obtener el derivado 4-hidroxilo 45D, que se fosforila con o-xililen-N,N-diisopropilfosforamidita según el protocolo descrito para 37D (véanse la Figura 6 y el ejemplo 19), para obtener un fosfito intermediario que se oxida *in situ* con hidroperóxido de terc-butilo, obteniéndose así el 1-O-bencil-2,3:5,6-di-O-ciclohexiliden-4-O-(o-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol 46D. Se trata el compuesto 46D según el mismo protocolo que el derivado 38D (véanse la Figura 6 y el ejemplo 19) con el fin de eliminar selectivamente el grupo protector ciclohexilideno que bloquea los hidroxilos 4 y 5, mediante un tratamiento en medio ácido, para obtener el diol 47D.

Se trata entonces el compuesto 47D sucesivamente con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) y luego con un derivado monoprotectado (grupo protector Z = benciloxicarbonilo) de la pentilamina, para generar los dos isómeros de posición: 48D (isómero portador del brazo en posición 6) y 49D (isómero portador del brazo en posición 5). Se separan los compuestos 48D y 49D por cromatografía y se desprotegen independientemente los compuestos 48D y 49D por hidrogenación catalítica como se describe para los compuestos 41D y 42D (véanse la Figura 6 y el ejemplo 19), para obtener, respectivamente, el compuesto 50D análogo del D-*mio*-inositol-4-fosfato portador de un grupo de reacción en la posición 6 del anillo de inositol y el compuesto 51D análogo del D-*mio*-inositol-4-fosfato portador de un grupo de reacción en la posición 5 del anillo de inositol (sólo los compuestos 48D y 50D que poseen el brazo en la posición 6 están representados en la Figura 7).

Procedimiento de síntesis de análogo del *mio*-inositol-4-fosfato que lleva un grupo de reacción G en posición 1 (véase la Figura 8):

Se trata el 1,2:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol 20 (que también se puede denominar 2,3:5,6-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol para mostrar su relación de estructura con el D-*mio*-inositol-4-fosfato, véase la Figura 3) en forma racémica, preparado según el protocolo de Vacca *et al.* [Vacca, J.P. Tetrahedron, 1989, 45 (17), 5679-5702], con bromuro de 4-metoxibencilo según un protocolo descrito por Wang *et al.* [J. Org Chem. 1996, 61, 5905-5910] con el fin de obtener el derivado mono-PMB (grupo protector PMB = p-metoxibencilo = 4-metoxibencilo, a veces denominado MPM = p-metoxifenilmetilo) 52. Se trata el derivado 52 (racémico) con el cloruro del ácido S(-)-canfánico, para obtener la mezcla de los dos diastereómeros (canfanato) 53D y 53L, y se aísla el compuesto 53D procediendo de manera análoga a lo que se describe para el compuesto 46D (véanse la Figura 7 y el texto correspondiente). De forma análoga, se saponifica el compuesto enantioméricamente puro 53D para obtener el compuesto 52D. Se fosforila el compuesto 52D con o-xililen-N,N-diisopropilfosforamidita según el protocolo descrito para 37D (véanse la Figura 6 y el ejemplo 19), para obtener un fosfito intermediario que se oxida *in situ* con hidroperóxido de terc-butilo, obteniéndose así el derivado 2,3:5,6-di-O-ciclohexiliden-4-O-(o-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol 54D, que se trata con CAN (Cerium Ammonium Nitrate) en una mezcla de acetona-agua según el protocolo de Wright *et al.* [Tetrahedron Lett. 2001, 42, 4033] para retirar el grupo protector PMB y obtener de este

modo el compuesto 55D que posee un hidroxilo libre en la posición 1 del anillo de inositol. Se trata entonces el compuesto 55D con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), para obtener el intermediario imidazoluro 56D, que se trata después con un derivado monoprotegido (grupo protector Z = benciloxicarbonilo) de la pentilamina para obtener el carbamato 57D portador de un brazo en la posición 1 del anillo de inositol. Se desprotege entonces el compuesto 57D por reducción catalítica de forma análoga a los compuestos 41D y 42D, para obtener el compuesto 58D análogo del D-*mio*-inositol-4-fosfato portador de un grupo de reacción en la posición 1 del anillo de inositol.

Procedimiento de síntesis de análogos del D-*mio*-inositol-4-fosfato que llevan un grupo de reacción G en posición 2 ó 3 (véase la Figura 9):

Se trata el 1-O-bencil-2,3-O-ciclohexiliden-4-O-(*o*-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol, compuesto 47D (véanse la Figura 7 y el texto relacionado) con bromuro de bencilo con el fin de proteger los hidroxilos en posición 5 y 6, para obtener el compuesto 59D, que se trata a continuación en medio ácido para retirar el grupo 2,3-ciclohexilideno y obtener el compuesto 60D. Se trata éste con fosgeno (como en el ejemplo 5) o con 1,1'-carbonildiimidazol (como en el ejemplo 19) para obtener un carbonato cíclico 61D, que se trata después con un derivado monoprotegido (grupo protector Z = benciloxicarbonilo) de la pentilamina para generar los dos isómeros de posición: 62D (isómero portador del brazo en posición 2) y 63D (isómero portador del brazo en posición 3). Se separan los compuestos 62D y 63D por cromatografía y se desprotegen independientemente los compuestos 62D y 63D por hidrogenación catalítica como se describe para los compuestos 41D y 42D (véanse la Figura 6 y el ejemplo 19), para obtener, respectivamente, el compuesto 64D análogo del D-*mio*-inositol-4-fosfato portador de un grupo de reacción en la posición 2 del anillo de inositol y el compuesto 65D análogo del D-*mio*-inositol-4-fosfato portador de un grupo de reacción en la posición 3 del anillo de inositol.

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-1-P que llevan dos grupos de reacción G en posición 4 y 5 (Figura 10):

Se describe un análogo del D-*mio*-inositol-1-fosfato [IP1(1)] que lleva grupos de reacción G en posición 4 y 5 (68D) en el esquema de síntesis representado en la Figura 10. El principio general de la síntesis de estos análogos disustituidos del D-*mio*-inositol-1-fosfato es un calco de las rutas de síntesis de los análogos monosustituidos antes descritos utilizando intermediarios que poseen un fosfato en su forma protegida (éster bencilico o éster de *o*-xililo) y que poseen tres hidroxilos protegidos y dos hidroxilos libres. La ruta de síntesis descrita (Figura 10) parte del compuesto 41D o del compuesto 42D o de la mezcla de estos dos compuestos preparados según el procedimiento descrito en el ejemplo 19. Se activa, o bien el hidroxilo en la posición 5 del compuesto 41D, o bien el hidroxilo en la posición 4 del compuesto 42D, mediante tratamiento con carbonildiimidazol (CDI), para formar, respectivamente, el derivado imidazolilo correspondiente 66D y 67D. Se trata cada compuesto a continuación con un derivado monoprotegido (grupo protector Z = benciloxicarbonilo) de la pentilamina (ejemplo 7), para generar el mismo compuesto 68D que lleva dos brazos en posición 4 y 5. Se separa el compuesto 68D por cromatografía y se desprotege luego por hidrogenación catalítica como se describe para los compuestos 41D o 42D (véanse la Figura 9 y el ejemplo 19), para obtener el 4,5-di-O-(5-aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato 69D análogo del D-*mio*-inositol-1-fosfato portador de dos grupos de reacción en la posición 4 y 5 del anillo de inositol. Se puede conjugar después este análogo con un marcador tal como la biotina, como se describe en el ejemplo 9, o un marcador fluorescente, como se describe en el ejemplo 10.

4. Conjuguados: naturaleza de M

Se pueden copular así los derivados del IP1 que llevan un grupo de reacción G en una de las posiciones 2 a 6 del inositol con una sustancia o molécula M.

Rastreadores

Esta sustancia o molécula M puede ser un rastreador, y en este caso el derivado del IP1 obtenido puede ser utilizado para detectar el IP1 presente en una muestra biológica de interés.

Los rastreadores habitualmente utilizados para el estudio de fenómenos biológicos o bioquímicos son los rastreadores fluorescentes, los rastreadores radiactivos o moléculas que tienen ellas mismas una afinidad por, o que son reconocidas por, una molécula compañera. También se pueden utilizar ciertas enzimas, como la peroxidasa o la luciferasa, que favorecen la aparición de un sustrato coloreado o de una señal de luminiscencia, respectivamente.

La sustancia o molécula M puede ser, por lo tanto, seleccionada entre el grupo siguiente: un radioelemento, un compuesto fluorescente, un compuesto luminescente, una enzima, un cromóforo fluorescente, un cromóforo absorbente de la luz o cualquier otra molécula o sustancia que permita una medición cuantitativa directa o indirecta, a condición de que, cuando M sea un radioelemento y L sea un enlace sencillo, entonces M sea diferente del tritio.

Se pueden copular así los análogos del IP1 según la invención a radioisótopos, tales como ^{125}I , ^{32}P o ^{35}S , o a una molécula marcada con uno de los isótopos siguientes: ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S o ^3H .

5 Los inventores proporcionan, en efecto, al experto en la materia análogos del IP1 que pueden copularse fácilmente a radioisótopos o a moléculas marcadas utilizando las técnicas clásicas de radiomarcaje.

10 El yodo 125, por ejemplo, que es fuertemente electrófilo, reaccionará con los análogos de la invención cuyo grupo funcional G lleva grupos nucleófilos, como, por ejemplo, los grupos arilo activados. En particular, los análogos según la invención cuyo grupo de reacción G lleva estructuras aromáticas substituidas por substituyentes electrodonadores pueden permitir un marcate del IP1 por reacciones de substitución electrófila sobre el núcleo aromático. A modo de ejemplo, los fenoles y los derivados de anilina o de alquilanilina que llevan funciones alcohol o amina primaria o secundaria son susceptibles de ser marcados con yodo-125.

15 Los análogos según la invención pueden igualmente copularse a moléculas que están ellas mismas radiomarcadas. En este método de radiomarcaje indirecto, la substancia o molécula que se ha de conjugar M comprende el radioisótopo y un grupo funcional susceptible de reaccionar con el grupo de reacción G del análogo IP1 según la invención.

20 Los análogos IP1 pueden también copularse a moléculas fluorescentes o luminescentes que lleven un grupo funcional susceptible de reaccionar con el grupo de reacción G llevado por el análogo IP1. Estas moléculas fluorescentes son, por ejemplo, las rodaminas, las cianinas, las escuarainas, los fluoróforos conocidos bajo la denominación BODIPY, las fluoresceínas, los compuestos conocidos bajo la denominación AlexaFluor, los quelatos de tierras raras, los criptatos de tierras raras, puntos cuánticos, proteínas fluorescentes como la proteína fluorescente verde (GFP) o sus variantes, las proteínas fluorescentes extraídas de corales y las ficobiliproteínas, tales como la B-ficoeritrina, la R-ficoeritrina, la C-ficocianina y las aloficocianinas, en particular las conocidas bajo la denominación XL665. Estos compuestos y los métodos que permiten introducir en ellos grupos de reacción o grupos funcionales están ampliamente descritos en la literatura; véase, por ejemplo, «Bioconjugate Techniques», Greg T. Hermanson, Academic press, 1996, pp. 298-364.

30 Los análogos IP1 pueden también copularse a enzimas, tales como la luciferasa o la peroxidasa, que generan un producto luminoso o de color, respectivamente, en presencia de su sustrato.

35 Los análogos IP1 según la invención pueden también copularse a un miembro de un par de compañeros de unión. Tales compañeros de unión son los pares avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo, como por ejemplo 6HIS/anticuerpo anti-6HIS, FLAG/anticuerpo anti-FLAG, DNP/anticuerpo anti-DNP, GST/anticuerpo anti-GST, Cmyc/anticuerpo anti-Cmyc y HA/anticuerpo anti-HA, y oligonucleótido de hebra sencilla/oligonucleótido de hebra sencilla complementario. En este caso, el IP1 así marcado podrá ser detectado de manera indirecta mediante la adición del segundo miembro del par de compañeros de unión, a su vez marcado con un rastreador, por ejemplo radiactivo o fluorescente.

40 Se describen reactivos que permiten marcar los análogos según la invención mediante grupos biotina en «Bioconjugate Techniques», Greg T. Hermanson, Academic press, 1996, pp. 373-398.

45 Soporte sólido

Los análogos del IP1 según la invención permiten copular IP1 a soportes sólidos, particularmente útiles para la realización de procedimientos de detección del IP1 en fase heterogénea.

50 En este caso, el grupo M puede ser una microperla magnética o no, el pocillo de una microplaca, un tubo, una microperla fluorescente o cualquier otro sistema de fase sólida necesario para un sistema de detección.

Inmunógeno

55 Los análogos IP1 según la invención permiten también preparar conjugados inmunogénicos que podrán ser utilizados para fabricar anticuerpos específicos para el IP1. Para ello, se copulan los análogos según la invención a moléculas portadoras altamente inmunogénicas. Estas moléculas pueden ser seleccionadas entre: la seroalbúmina bovina (BSA) o la BSA catiónica (cBSA), la KLH (keyhole Limpet Hemocyanine o hemocianina de lapa), la tiroglobulina y la ovoalbúmina. Las moléculas portadoras pueden ser también liposomas o moléculas portadoras sintéticas, como polímeros de L-lisina o de ácido L-glutámico, ficoll, dextrano o también polietilenglicol.

60 Estas moléculas portadoras llevan generalmente grupos funcionales que reaccionarán con el grupo de reacción G de los análogos IP1 según la invención, o bien se podrán introducir tales grupos por técnicas clásicas.

Es importante observar que los inmunógenos según la invención permitirán obtener anticuerpos específicos para el IP1, ya que la función fosfato del inositol, que es la única diferencia entre el IP1 y el inositol, permanece intacta durante la copulación con la molécula portadora.

5 5. Ligandos específicos para el IP1:

Los análogos del IP1 o los inmunógenos IP1 según la invención pueden ser utilizados para seleccionar o producir ligandos que reconozcan específicamente el IP1. Estos ligandos, cuya obtención resulta posible gracias a disponer de los derivados del IP1 según la invención, forman, pues, parte integrante de la invención.

10 Estos ligandos pueden especialmente ser aptámeros, péptidos o proteínas, en particular anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (Fab o Fab'). Los sistemas de selección que requieren la utilización de los análogos del IP1 o de los inmunógenos IP1 pueden ser especialmente sistemas de selección que utilicen fagos o ribosomas («phage display» o «ribosomal display»). Estos sistemas necesitan, todos ellos, la utilización de derivados del IP1 según la invención.

15 La invención se relaciona, en particular, con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-IP1. La obtención de tales anticuerpos resulta posible gracias a los análogos IP1 desarrollados por los inventores. Estos anticuerpos específicos para el IP1 son una herramienta particularmente útil para detectar específicamente el IP1. Al contener el medio celular, en general, otros muchos derivados del inositol (PIP2, PIP3, IP3, IP2, IP4, inositol), los anticuerpos anti-IP1 deben presentar reacciones cruzadas con estos derivados lo más débiles posible. Los anticuerpos anti-IP1 según la invención presentan una reacción cruzada con los derivados del inositol (PIP2, IP3, IP2, IP4, inositol) inferior al 5%. Se prefieren particularmente los anticuerpos anti-IP1 donde la reacción cruzada de los anticuerpos con estos derivados del inositol es inferior al 1%.

20 Por otra parte, los anticuerpos anti-IP1 según la invención presentan una selectividad de fijación del IP1 al menos 10 veces superior a su fijación sobre los otros derivados del inositol, tales como el PIP2, el PIP3, el IP3, el IP2, el IP4 y el inositol. Se prefieren los anticuerpos que tienen una selectividad para el IP1 al menos 100 veces superior a su selectividad para los otros derivados del inositol. En otras palabras, cuando los anticuerpos anti-IP1 según la invención son incubados con el IP1, su unión al IP1 permanece estable cuando se añaden dichos derivados al medio de incubación. Esto es fácilmente medible determinando por las técnicas de bioquímica clásica la cantidad de complejo IP1/anticuerpo anti-IP1 en presencia o en ausencia de uno de dichos derivados. En particular, la unión de los anticuerpos anti-IP1 según la invención al IP1 no se desplaza en presencia de 50 µM de uno de los compuestos siguientes: PIP2, PIP3, IP3, IP2, IP4 e inositol.

35 Los anticuerpos según la invención son fabricados según un procedimiento que incluye una etapa de inmunización de un mamífero con un conjugado inmunogénico según la invención, tal como se ha descrito anteriormente, que tiene la particularidad de presentar al sistema inmunitario una unidad única específica del IP1, a saber, un inositol substituido por un solo grupo fosfato en posición 1.

40 Los anticuerpos policlonales anti-IP1 son obtenidos por inyección del inmunógeno en un mamífero y, tras un período necesario para la inducción de la inmunidad, se pueden recoger los sueros de los animales y purificar los anticuerpos policlonales, por ejemplo por cromatografía de afinidad.

45 Los anticuerpos monoclonales anti-IP1 pueden ser producidos utilizando diversas técnicas conocidas por el experto en la materia. A modo de ejemplo, se puede evocar la técnica procedente de los trabajos de Köhler y Milstein. Consiste en inmunizar un mamífero, por ejemplo el ratón, con un antígeno. En caso de que el antígeno sea de pequeño tamaño, como es el caso del IP1, éste debe ser copulado a una molécula portadora inmunogénica. El experto en la técnica utilizará, pues, ventajosamente los conjugados IP1-molécula portadora según la invención. Varias semanas después de la inmunización, se extrae el bazo del ratón inmunizado con el antígeno. Se fusiona una mezcla de linfocitos y de plasmocitos procedentes de este bazo *in vitro* con células mielomatosas en presencia de un inductor de fusión celular, como el polietilenglicol. Se utiliza una línea celular mielomatosa mutante, desprovista de hipoxantina guanosina fosforribosil transferasa (HGPRT), para permitir seleccionar fácilmente las células híbridas. Se cultivan estas células en un medio que contiene hipoxantina, aminopterina (metotrexato) y timina (medio HAT) con el fin de eliminar las células mielomatosas no fusionadas y de seleccionar los hibridomas de interés. Las células de bazo no fusionadas mueren, ya que no son capaces de proliferar *in vitro*. Las células híbridas, en cambio, sobreviven. Se cultivan los hibridomas así obtenidos en los pocillos de una placa de cultivo celular. Se estudian los sobrenadantes de estos pocillos en cuanto a la presencia de anticuerpos específicos para el IP1 en una prueba de cribado, tal como ELISA o RIA, como se describirá más adelante. Se clonan a continuación los hibridomas y se pueden inyectar en mamíferos para inducir mielomas que segregan en gran cantidad el anticuerpo anti-IP1 al líquido ascítico.

60 Ensayo ELISA (ensayo enzimático sobre inmunoabsorbente) que permite detectar la presencia de anticuerpos que reconocen específicamente el IP1

Formato indirecto: Tras dilución, se incuban las muestras de sueros que contienen los anticuerpos policlonales anti-IP1 (o los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas en el caso de anticuerpos monoclonales anti-IP1) en los pocillos de una placa de microtitulación recubierta de estreptavidina y previamente incubada con una solución de conjugado biotina-IP1 (obtenido a partir de un análogo IP1 según la invención) y lavada después. Tras incubación en presencia de sueros diluidos, se lavan los pocillos y se incuban en presencia de anticuerpos antiespecie marcados con peroxidasa (conjugado Ac-HRP). Después de lavar el conjugado Ac-HRP en exceso, se efectúa una etapa de revelación añadiendo el sustrato. Por lectura fotométrica, se mide un valor de densidad óptica a 450 nm que indica la presencia de anticuerpos anti-IP1 en los sueros o los sobrenadantes de cultivo. La intensidad de la DO medida a 450 nm es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-IP1 presentes en el pocillo.

Ensayo RIA (ensayo radioinmunológico) que permite detectar la presencia de anticuerpos que reconocen específicamente el IP1:

Formato semidirecto: Tras dilución, se incuban las muestras de sueros (o los sobrenadantes de cultivo de los clones de hibridomas) en tubos de plástico o en los pocillos de una placa de microtitulación recubiertos de anticuerpos antiespecie (por ejemplo, antirratón si se fabricaron los anticuerpos anti-IP1 por inmunización de ratones) en presencia de un análogo funcionalizado de IP1 según la invención marcado con ayuda de un radioisótopo (rastreador). Tras incubación y lavado, se mide la radiactividad ligada al soporte y se ve que el análogo funcionalizado de IP1 marcado con el radioisótopo es reconocido por anticuerpos anti-IP1 presentes en los sueros o en los sobrenadantes de cultivo.

6. Utilización de los conjugados y ligandos específicos del IP1:

Se pueden utilizar los diferentes análogos del IP1 y ligandos específicos del IP1 antes descritos en procedimientos de detección del IP1 presente en una muestra biológica. Como se ha indicado anteriormente, la titulación del IP1 permite estudiar los mecanismos bioquímicos que implican la ruta de señalización de los fosfatos de inositol. Las herramientas proporcionadas por los inventores pueden ser, por ejemplo, utilizadas en métodos de cribado de bancos de compuestos con el fin de identificar moléculas que tienen una acción sobre receptores de tipo GPCR, teniendo los receptores una actividad tirosina-kinasa, o también para el estudio de compuestos que tienen una actividad reguladora (activadora o inhibidora) sobre las enzimas responsables de la producción de IP1 (fosfolipasa, inositol fosfatasas). Estos métodos incluyen siempre una etapa de introducción de la molécula de estudio (procedente, por ejemplo, de un banco de compuestos) en la muestra biológica, seguida de la detección de una variación cualitativa o cuantitativa del IP1 producido en dicha muestra biológica.

Según la invención, el procedimiento de detección del IP1 contenido en una muestra comprende las etapas siguientes:

- contacto de la muestra con un ligando específico del IP1;
- detección de los complejos formados entre dicho ligando y el IP1 presente en la muestra.

Por muestra biológica, se entiende, por ejemplo, una preparación de membranas, una suspensión celular, un cultivo celular o también una preparación que contenga GPCR, proteínas G y fosfolipasas.

Por «detección de los complejos formados por el ligando específico del IP1 y el IP1 presente en la muestra», se entiende la detección directa de estos complejos, o bien la detección indirecta, que implica la detección de otra especie cuya concentración se correlaciona con la de los complejos ligando/IP1 de la muestra. Los métodos de titulación por competición son un buen ejemplo de determinación indirecta de la presencia de IP1 en una muestra. En estos métodos, se tiene una competición entre el IP1 presente en la muestra y el IP1 tritiado o el IP1 marcado por la fijación sobre el ligando específico del IP1. En estos métodos, se detecta la evolución de la cantidad de complejo ligando/IP1 marcado introducido en el medio de medición. La formación de complejo ligando/IP1 marcado disminuirá cuando aumente la cantidad de complejos ligando/IP1 de la muestra.

En una realización particular de este procedimiento de detección del IP1, se marca el ligando específico del IP1 con un rastreador.

En otra realización particular, el procedimiento incluye, pues, la adición a la muestra de una cantidad conocida de IP1 tritiado o de IP1 marcado directa o indirectamente con un rastreador. Dicho de otro modo, el procedimiento comprende las etapas siguientes:

- contacto de la muestra con un ligando específico del IP1;
- contacto de la muestra con una cantidad conocida de IP1 tritiado o de IP1 marcado directa o indirectamente con un rastreador;
- detección de los complejos formados entre dicho ligando y el IP1 presente en la muestra.

Por marcaje directo, se entiende el marcaje covalente eventualmente a través de un brazo de espaciamento, tal como el grupo de unión L antes descrito.

Por marcaje indirecto, se entiende el marcaje a través de un par de compañeros de unión, tales como los antes definidos. Se puede marcar un ligando específico del IP1 o un análogo del IP1 indirectamente si se une a un miembro de un par de compañeros de unión y se añade al medio de medición el segundo miembro de este par, marcado con un rastreador. Por ejemplo, se puede unir el IP1 a biotina y marcarlo indirectamente con alofocianina (APC) si se añade al medio estreptavidina copulada a APC, teniendo la estreptavidina una muy fuerte afinidad por la biotina.

El rastreador que puede conjugarse con el IP1 o con el ligando específico del IP1 puede ser seleccionado entre: un radioelemento, un compuesto fluorescente, un compuesto luminiscente, una enzima, un cromóforo fluorescente, un cromóforo absorbente de la luz o cualquier otra molécula o sustancia que permita una medición cuantitativa directa o indirecta.

En otro modo de realización particular, el ligando específico del IP1 y el IP1 son ambos marcados directa o indirectamente con rastreadores. Es, por ejemplo, el caso en los procedimientos de detección basados en una transferencia de energía entre un compuesto fluorescente donador y un compuesto fluorescente aceptor (FRET).

En una realización particular de este procedimiento, se conjuga directa o indirectamente el ligando específico del IP1 con un compuesto donador, se pone en contacto la muestra con IP1 conjugado directa o indirectamente con un compuesto aceptor y se mide la señal emitida por el compuesto aceptor, resultando esta señal de una transferencia de proximidad entre el donador y el aceptor y siendo inversamente proporcional a la cantidad de IP1 presente en la muestra.

En otra realización, el ligando específico del IP1 es conjugado directa o indirectamente con un compuesto aceptor, se pone en contacto la muestra con IP1 conjugado directa o indirectamente con un compuesto donador y se mide la señal emitida por el compuesto aceptor, resultando esta señal de una transferencia de proximidad entre el donador y el aceptor y siendo inversamente proporcional a la cantidad de IP1 presente en la muestra.

Preferentemente, el compuesto donador y el compuesto aceptor son compuestos fluorescentes, la transferencia de proximidad es una transferencia de energía y la señal emitida es una señal fluorescente.

El compuesto fluorescente donador puede ser un criptato o un quelato de tierras raras y el compuesto fluorescente aceptor puede ser seleccionado entre: las cianinas, las rodaminas, las escuarainas, los BODIPY, las fluoresceínas, los AlexaFluor, los puntos cuánticos, las ficobiliproteínas, tales como la B-ficoeritrina, la R-ficoeritrina, la C-ficocianina y la alofocianina, la GFP y sus derivados y una proteína fluorescente de coral.

Los ligandos específicos del IP1 utilizados en los procedimientos de detección del IP1 según la invención son obtenidos gracias a los derivados IP1 tales como los descritos anteriormente: estos ligandos específicos del IP1 pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales producidos por inmunización de mamíferos con los derivados IP1 según la invención, o también proteínas, aptámeros o péptidos que reconozcan específicamente el IP1, y seleccionados por las técnicas de «phage display» o «ribosomal display» como se ha mencionado anteriormente. Preferentemente, el ligando específico del IP1 utilizado es un anticuerpo monoclonal o policlonal cuya selectividad para el IP1 es al menos 10 veces superior, preferentemente 100 veces superior, a su selectividad para cada uno de los compuestos siguientes: inositol, IP2, IP3, IP4, PIP2 y PIP3.

En un modo de realización particular del procedimiento de detección del IP1 según la invención, el ligando específico del IP1 o el IP1 marcado está directa o indirectamente unido a un soporte sólido. Es, por ejemplo, el caso cuando se utiliza la técnica SPA (Scintillation Proximity Assay): el ligando específico del IP1 se unirá covalentemente a perlas SPA. Es igualmente el caso en la titulación ELISA descrita en el ejemplo 17.

En caso de que el análogo de IP1 esté copulado a un soporte sólido, puede estar unido al mismo de manera covalente, como se ha descrito anteriormente. El análogo de IP1 puede también unirse al soporte sólido de manera indirecta: es, por ejemplo, el caso si el análogo de IP1 es el IP1-biotina y el soporte sólido está recubierto de estreptavidina. En esta realización particular del procedimiento de titulación del IP1, el ligando específico del IP1 está marcado con un rastreador (radiactivo, fluorescente, enzimático u otro) que permitirá la detección del complejo análogo IP1/ligando específico del IP1. Si el ligando específico del IP1 es un anticuerpo anti-IP1, este último podrá igualmente ser detectado por adición a la muestra de un anticuerpo antiespecie marcado con un rastreador.

Una realización particular del procedimiento de detección del IP1 según la invención consiste, pues, en poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para el IP1 y un análogo del IP1 fijado sobre un soporte sólido y en realizar además las etapas siguientes:

- lavado del soporte sólido;
- adición de un anticuerpo antiespecie que reconozca el anticuerpo anti-IP1, estando dicho anticuerpo antiespecie marcado con un rastreador;
- detección del anticuerpo antiespecie, siendo la cantidad de anticuerpo antiespecie inversamente proporcional a la cantidad de complejo anticuerpo anti-IP1/IP1 presente en la muestra.

El ligando específico del IP1 puede igualmente unirse al soporte sólido de manera covalente, o bien de manera indirecta si el soporte sólido está recubierto de un anticuerpo antiespecie, por ejemplo antirrata si el ligando específico del IP1 es un anticuerpo anti-IP1 obtenido por inmunización de ratas. En esta realización particular, se marcará el análogo de IP1 con un rastreador (radiactivo, fluorescente o enzimático) que permitirá la detección del complejo análogo IP1/ligando específico del IP1.

Una variante del procedimiento consiste, pues, en poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para el IP1 fijado a un soporte sólido y con un análogo del IP1 marcado con un rastreador y en realizar luego las siguientes etapas:

- contacto de la muestra con un anticuerpo anti-IP1 fijado sobre un soporte sólido y con un análogo del IP1 marcado con un rastreador, y que incluye además las etapas siguientes:
- lavado del soporte sólido;
- detección del IP1 marcado;

siendo la cantidad de IP1 marcado inversamente proporcional a la cantidad de complejo anticuerpo anti-IP1/IP1 presente en la muestra.

Se pueden utilizar otras técnicas conocidas por el experto en la materia para realizar los procedimientos de detección del IP1 según la invención. Se pueden citar especialmente las técnicas de polarización o también de espectroscopia de correlación de fluorescencia. En todos los casos, estas técnicas se basan en la formación de complejo ligando específico del IP1-IP1, seguida de una etapa de detección de los complejos formados.

Los ejemplos de ensayo siguientes ilustran el procedimiento de titulación del IP1 según la invención:

Ensayos ELISA que permiten la titulación del IP1:

Durante la puesta a punto de un ensayo ELISA, se pueden contemplar dos formatos de ensayo:

- En un primer formato, se fija previamente un análogo del IP1 funcionalizado según la invención sobre una fase sólida. Se incuba a continuación la muestra biológica que contiene el IP1 que se ha de titular en presencia del complejo formado sobre la fase sólida con un primer anticuerpo anti-IP1. Después de una etapa de lavado que elimina las especies no fijadas sobre la fase sólida, se añade entonces un segundo anticuerpo antiespecie marcado con una enzima de tipo HRP, dirigido contra el anticuerpo anti-IP1, al pocillo de reacción. Después de una etapa de lavado que elimina el exceso del segundo anticuerpo no fijado, se añade al pocillo de reacción un sustrato de la enzima HRP llevada por el segundo anticuerpo para generar la aparición de una señal colorimétrica. La intensidad de esta señal, medida en un espectrofotómetro, será inversamente proporcional a la cantidad de IP1 contenida en la muestra biológica.
- En un segundo formato, se fijará previamente un anticuerpo anti-IP1 sobre la fase sólida. Se puede realizar esta fijación de dos maneras: o bien por adsorción pasiva, o bien utilizando una fase sólida inmunológicamente reactiva portadora de un anticuerpo secundario antiespecie. Se incuba entonces la muestra biológica que contiene el IP1 que se ha de titular en presencia de un análogo del IP1 funcionalizado según la invención. En este formato, tendrá privilegio la utilización de un análogo IP1-biotina. Después de una etapa de lavado que elimina las especies no fijadas a la fase sólida, se añade entonces estreptavidina marcada con una enzima de tipo HRP al pocillo de reacción. Después de una etapa de lavado que elimina el exceso de estreptavidina no fijada, se añade al pocillo de reacción un sustrato de la enzima HRP llevada por la estreptavidina para generar la aparición de una señal colorimétrica. La intensidad de esta señal, medida en un espectrofotómetro, será inversamente proporcional a la cantidad de IP1 contenida en la muestra biológica.

Ensayo HTRF (ensayo fluorométrico homogéneo en tiempo resuelto) que detecta el IP1 por competición.

Estos ensayos pueden ser efectuados bajo diferentes formatos:

Formato directo: se incuban las muestras que contienen el IP1 que se ha de titular en los pocillos de una placa de microtitulación en presencia de un conjugado IP1-cianina (o más en general de un conjugado IP1-aceptor de FRET) y de un conjugado de anticuerpo anti-IP1 marcado con un criptato de europio (o más en general un complejo de lantánido utilizable como donador de FRET). Como aceptor de FRET, se entiende cualquier molécula fluorescente

que presente un recubrimiento espectral entre su espectro de excitación y el espectro de emisión del lantánido utilizado como donador de FRET.

5 También se incuban en los pocillos de una placa de microtitulación un control positivo que contiene únicamente el conjugado IP1-cianina y el conjugado anti-IP1-criptato de europio y un control negativo que contiene únicamente el conjugado anti-IP1-criptato de europio.

10 Se detectan las fluorescencias emitidas a la longitud de onda de emisión del aceptor de FRET (665 nm en el caso de la cianina) y a la longitud de onda de emisión del donador de FRET (620 nm en el caso del aceptor de FRET) en tiempo resuelto tras excitación del donador de FRET (337 nm en el caso del criptato de europio). Se calcula entonces la razón (fluorescencia procedente del aceptor)/(fluorescencia procedente del donador) para todos los pocillos que contienen las muestras que se han de titular o el control positivo o el control negativo. La diferencia de razón observada entre el control positivo y el control negativo (DR de referencia) indica la presencia de una interacción específica entre el anticuerpo anti-IP1 y el análogo IP1. En caso de que una muestra contenga IP1, éste competirá con el análogo IP1-aceptor en su unión al conjugado anticuerpo-criptato de europio. El valor de DR obtenido en presencia de tal muestra (DR muestra) será más bajo que el de la DR de referencia. Cuanto más importante sea la diferencia entre la DR de referencia y la DR muestra, más IP1 contendrá la muestra.

20 Se puede efectuar el mismo tipo de ensayo HTRF utilizando un conjugado IP1-donador y un conjugado anticuerpo-aceptor.

25 Formato semidirecto: se incuban las muestras que contienen el IP1 que se ha de titular en los pocillos de una placa de microtitulación en presencia de un conjugado IP1-biotina, de estreptavidina-XL665 (o más en general de un conjugado aceptor de FRET) y de un conjugado anticuerpo anti-IP1 marcado con un criptato de europio (o más en general un complejo de lantánidos utilizable como donador de FRET).

Como aceptor de FRET, se entiende cualquier molécula fluorescente que presente un recubrimiento espectral entre su espectro de excitación y el espectro de emisión del lantánido utilizado como donador de FRET.

30 También se incuban en los pocillos de una placa de microtitulación un control positivo que contiene únicamente el conjugado IP1-biotina, estreptavidina-XL665 y el conjugado anti-IP1-criptato de europio y un control negativo que contiene únicamente el conjugado anti-IP1-criptato de europio y la estreptavidina-XL665.

35 La detección de las fluorescencias emitidas por el donador y el aceptor de FRET y el cálculo de los resultados son idénticos a lo que se ha descrito anteriormente para un formato directo.

«XL665» designa una alofococianina entrecruzada comercializada por Cis Bio International.

40 Formato indirecto: se incuban las muestras que contienen el IP1 que se ha de titular en los pocillos de una placa de microtitulación en presencia de un conjugado IP1-biotina, de estreptavidina-XL665 (o más en general de un conjugado aceptor de FRET) y de un anticuerpo anti-IP1 y de un anticuerpo antiespecie que reconoce el anticuerpo anti-IP1 y que está marcado con un criptato de europio (o más en general un complejo de lantánidos utilizable como donador de FRET).

45 Como aceptor de FRET, se entiende cualquier molécula fluorescente que presente un recubrimiento espectral entre su espectro de excitación y el espectro de emisión del lantánido utilizado como donador de FRET.

50 También se incuban en los pocillos de una placa de microtitulación un control positivo que contiene únicamente el conjugado IP1-biotina, estreptavidina-XL665, el anticuerpo anti-IP1 y el conjugado antiespecie-criptato de europio y un control negativo que contiene únicamente el anticuerpo anti-IP1, el conjugado antiespecie-criptato de europio y la estreptavidina-XL665.

55 La detección de las fluorescencias emitidas por el donador y el aceptor de FRET y el cálculo de los resultados son idénticos a lo que se ha descrito con anterioridad para un formato directo.

60 Estos ensayos HTRF directos, semidirectos o indirectos están particularmente adaptados al cribado de librerías de compuestos químicos, de los que se quiere estudiar, por ejemplo, el efecto agonista, antagonista o agonista inverso sobre un receptor de membrana dado, cuya activación conlleva una elevación de la tasa de IP1 intracelular. Estos ensayos pueden ser llevados a la práctica sobre células utilizando los análogos de IP1 y los anticuerpos anti-IP1 según la invención.

La invención proporciona, por lo tanto, un procedimiento de cribado de compuestos agonistas de un receptor de membrana cuya activación conlleva la producción de IP1 en la célula, consistiendo este procedimiento en las etapas

siguientes:

- 5 (i) Adición del compuesto de ensayo a un medio de cultivo que contiene células que expresan un receptor cuya activación conlleva la producción de IP1.
 (ii) Determinación de la cantidad de IP1 con ayuda de los procedimientos según la invención.
 (iii) Comparación de la cantidad de IP1 determinada en presencia y en ausencia de este compuesto, permitiendo un aumento de la cantidad de IP1 identificar el compuesto de ensayo como agonista de dicho receptor.

10 En una realización preferida de este procedimiento, la etapa (ii) incluye la adición al medio de un anticuerpo anti-IP1 marcado con un compuesto fluorescente donador o aceptor, así como la adición de IP1 marcado con un compuesto fluorescente aceptor o, respectivamente, donador, y la determinación de la cantidad de IP1 consiste en medir la señal luminosa resultante de la transferencia de energía entre los dos compuestos fluorescentes, y la etapa (iii) incluye la comparación de la señal medida en presencia y en ausencia de compuesto de ensayo, permitiendo una
 15 disminución de la señal medida en presencia de compuesto de ensayo identificar este compuesto como un agonista de dicho receptor.

La invención proporciona igualmente un procedimiento de cribado de compuestos antagonistas de un receptor de membrana cuya activación conlleva la producción de IP1 en la célula, consistiendo este procedimiento en las etapas
 20 siguientes:

- (i) Adición del compuesto de ensayo a un medio de cultivo que contiene células que expresan un receptor cuya activación conlleva la producción de IP1.
 25 (ii) Adición de un agonista conocido de dicho receptor.
 (iii) Determinación de la cantidad de IP1 con ayuda de los procedimientos según la invención.
 (iv) Comparación de la cantidad de IP1 determinada en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, permitiendo una disminución de la cantidad de IP1 identificar el compuesto de ensayo como antagonista de dicho receptor.

30 La etapa (iii) incluye la adición al medio de un anticuerpo anti-IP1 marcado con un compuesto fluorescente donador o aceptor, así como la adición de IP1 marcado con un compuesto fluorescente aceptor o, respectivamente, donador, y la determinación de la cantidad de IP1 consiste en medir la señal luminosa resultante de la transferencia de energía entre los dos compuestos fluorescentes, y la etapa (iv) incluye la comparación de la señal medida en presencia y en ausencia de compuesto de ensayo, permitiendo un aumento de la señal medida en presencia de
 35 compuesto de ensayo identificar este compuesto como un antagonista de dicho receptor.

La invención proporciona igualmente un procedimiento de cribado de compuestos agonistas inversos de un receptor de membrana constitutivamente activo. Se considera que un receptor es constitutivamente activo cuando posee una actividad intrínseca y basal de copulación a las proteínas G y/o se asocia a una producción de segundos mensajeros
 40 en ausencia de estimulación por su agonista. En este caso, un agonista inverso tendrá como efecto disminuir la amplitud de esta respuesta basal, en otras palabras, reducir o anular la producción permanente de IP1 por este receptor en ausencia de estimulación por su agonista.

Un método de cribado de compuestos que provoquen una disminución de esta actividad constitutiva puede permitir
 45 identificar nuevos medicamentos.

El procedimiento de cribado de compuestos agonistas inversos de un receptor de membrana constitutivamente activo comprende las etapas siguientes:

- 50 (i) Adición del compuesto de ensayo a un medio de cultivo que contiene células que expresan un receptor constitutivamente activo y cuya actividad conlleva la producción de IP1.
 (ii) Determinación de la cantidad de IP1 con ayuda de los procedimientos según la invención.
 (iii) Comparación de la cantidad de IP1 determinada en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, permitiendo una disminución de la cantidad de IP1 identificar el compuesto de ensayo como agonista inverso
 55 de dicho receptor.

En una realización preferida de este procedimiento, la etapa (ii) incluye la adición al medio de un anticuerpo anti-IP1 marcado con un compuesto fluorescente donador o aceptor, así como la adición de IP1 marcado con un compuesto fluorescente aceptor o, respectivamente, donador, y la determinación de la cantidad de IP1 consiste en medir la
 60 señal luminosa resultante de la transferencia de energía entre los dos compuestos fluorescentes, y la etapa (iii) incluye la comparación de la señal medida en presencia y en ausencia de compuesto de ensayo, permitiendo un aumento de la señal medida en presencia de compuesto de ensayo identificar este compuesto como un agonista inverso de dicho receptor.

El experto en la materia está en condiciones de adaptar estos procedimientos para poner en evidencia otros tipos de reguladores de la actividad de receptores de transmembrana, como por ejemplo los moduladores alostéricos positivos que potencian los efectos agonistas.

5 7. Kits

La invención se relaciona también con kits que permiten realizar estas técnicas de titulación del IP1. Estos kits incluyen (i) un análogo de IP1 según la invención o IP1 tritiado y (ii) un ligando específico del IP1, estando marcado uno al menos de estos elementos directa o indirectamente con un rastreador, tal como un radioelemento, un compuesto fluorescente, un compuesto luminescente, una enzima, un cromóforo fluorescente, un cromóforo absorbente de la luz o cualquier otra molécula o sustancia que permita una medición cuantitativa directa o indirecta.

Los kits según la invención pueden contener un compuesto donador y un compuesto aceptor que emite una señal resultante de una transferencia de proximidad con el compuesto donador, estando unido el compuesto donador directa o indirectamente al análogo del IP1 y estando unido el compuesto aceptor directa o indirectamente al ligando específico del IP1. En otra realización de estos kits, el compuesto aceptor está unido directa o indirectamente al análogo del IP1 y el compuesto donador está unido directa o indirectamente al ligando específico del IP1. Ventajosamente, el compuesto donador y el compuesto aceptor son compuestos fluorescentes, la transferencia de proximidad es una transferencia de energía y la señal emitida es una señal fluorescente.

Un compuesto fluorescente donador es un compuesto fluorescente que, tras excitación a una longitud de onda determinada, emitirá una señal fluorescente, la cual, operando una transferencia de energía, excitará al compuesto fluorescente aceptor. Se pueden utilizar numerosos compuestos fluorescentes donadores en el marco de la presente invención. A modo de ejemplo, se pueden citar los criptatos de tierras raras (Europio, Terbio) descritos en las patentes EP 180.492, EP 321.353 y EP 601.113, así como los quelatos de tierras raras.

Un compuesto fluorescente aceptor es un compuesto fluorescente que, tras excitación por transferencia de energía del compuesto donador emitirá una señal fluorescente a una longitud de onda dada. Existen numerosos compuestos aceptores susceptibles de ser utilizados para llevar a cabo los procedimientos según la presente invención, entre los cuales se encuentran: las alofocianinas, la alofocianina entrecruzada, tal como la XL665 (CIS Bio International), las cianinas, tales como la CY5, las rodaminas, las escuarainas, los BODIPY, las fluoresceínas y los AlexaFluor.

Preferentemente, el ligando específico del IP1 contenido en estos kits es un anticuerpo policlonal o monoclonal anti-IP1, obtenido por inmunización de un mamífero con un conjugado IP1-molécula portadora.

Los kits según la invención pueden también contener cloruro de litio o cualquier otro producto que permita bloquear ciertas enzimas del ciclo del inositol y favorezca así la acumulación de IP1 en la muestra.

Según el tipo de técnica de titulación utilizado, estos kits contendrán los componentes adicionales clásicos, a saber, soportes sólidos, anticuerpos antiespecie o cualquier otro componente conocido y ampliamente utilizado en este tipo de producto.

Los ejemplos siguientes ilustran una ruta de síntesis de los compuestos según la invención, así como su utilización.

45 **Ejemplo 1:** Síntesis del 2,3-O-[(1R,4R)-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]hept-2-ilideno]-D-*mio*-inositol (inositolalcanfor) (compuesto 2)

Se suspende *mio*-inositol comercial (compuesto 1) (4,2 g) en DMSO anhidro (50 ml) con D-alcanfor dimetilacetal (9,3 g). Se agita la mezcla a 50°C durante 3 h, se neutraliza con trietilamina y se concentra a vacío.

Se recoge el residuo con una solución que contiene 18 mg de ácido para-toluensulfónico hidratado en una mezcla de metanol y de cloroformo. Después de una noche bajo agitación a 20°C, se añade trietilamina y se filtra el precipitado obtenido, se lava con cloroformo y se suspende luego en agua, se agita durante 15 min. y se filtra después. Se lava el precipitado con agua y cloroformo y luego se seca.

55 Rendimiento 4,8 g (65%).

CCM (Sílice) Rf = 0,51 (10% MeOH/AcOEt).

SM-ESI(+): m/z = 315 [M+H]⁺, 337 [M+Na]⁺.

[α]_D = +19,3 (c=1, DMSO).

60

Ejemplo 2: Síntesis del [1R-(1 α ,2 α ,4 α)-2,3-O-[(1R,4R)-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]hept-2-iliden]-1-bis(fenilmetil)fosfato]-D-*mio*-inositol (compuesto 3)

Se vuelve anhidro el compuesto 2 del ejemplo 1 (2,5 g) y se recoge en piridina anhidra (30 ml). Se enfría la solución (4°C) bajo atmósfera de nitrógeno y se añade fosfoclorhidrato de dibencilo (3,5 g) gota a gota bajo agitación. Después de 3 h bajo agitación, se diluye la mezcla con acetato de etilo y se lava después con una solución acuosa saturada de hidrógeno carbonato de sodio. Se concentra la fase orgánica y se coevapora luego con tolueno y se purifica el residuo por cromatografía en columna de sílice (2-15% MeOH/CH₂Cl₂). Se cristaliza entonces el compuesto buscado en una mezcla AcOEt/heptano (1:4).

Rendimiento 1,4 g (30%).
CCM (Sílice) Rf = 0,25 (5% MeOH/AcOEt).
[α]_D = -8,3 (c=1, CHCl₃).
RMN-³¹P (CDCl₃): δ (ppm) = -1,61.

Ejemplo 3: Síntesis del 4,5,6-tri-O-fenilmetiloxicarbonil[1R-(1 α ,2 α ,4 α)-2,3-O-[(1R,4R)-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]hept-2-iliden]-1-bis(fenilmetil)fosfato]-D-*mio*-inositol (compuesto 4, Z = benciloxicarbonilo)

Se recoge el compuesto 3 del ejemplo 2 (0,7 g) en diclorometano y se añade luego trietilamina (340 μ l) y DMAP (6 mg) y se enfría la solución agitada (0°C) bajo nitrógeno. Se añaden 1,04 ml de cloruro de benciloxicarbonilo a lo largo de un período de 30 min. y se deja luego durante 18 h bajo agitación a temperatura ambiente. Se lava la mezcla de reacción con una solución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio (al 10%) y después con una solución saturada de NaCl; se concentra la fase orgánica a vacío y se purifica el residuo por cromatografía en columna de sílice (2-10% AcOEt/tolueno). Se obtiene el compuesto buscado en forma de una goma.

Rendimiento 0,7 g (57%).
CCM (Sílice) Rf = 0,49 (20% AcOEt/tolueno).
[α]_D = -19,6 (c=1, CHCl₃).

Ejemplo 4: Síntesis del 4,5,6-tri-O-fenilmetiloxicarbonil-1-bis(fenilmetil)fosfato]-D-*mio*-inositol (compuesto 5)

Se disuelve el compuesto 4 del ejemplo 3 (0,2 g) en diclorometano, se enfría la solución (0°C) y se añaden 400 μ l de una mezcla TFA/H₂O 95/5. Después de 3 h bajo agitación a 0°C, se evapora la mezcla y se coevapora cuatro veces en presencia de tolueno. Se purifica el residuo por cromatografía en columna de sílice (AcOEt/tolueno y luego MeOH/tolueno). Se obtiene el compuesto buscado en forma de una espuma.

Rendimiento 0,16 g (57%).
CCM (Sílice) Rf = 0,41 (MeOH/AcOEt/tolueno, 1/2/7).
[α]_D = -7,69 (c=1, CHCl₃).

Ejemplo 5: Síntesis del 2,3-O-carbonato-4,5,6-tri-O-fenilmetiloxicarbonil-1-bis(fenilmetil)fosfato]-D-*mio*-inositol (compuesto 6)

Se disuelve el compuesto 5 del ejemplo 4 (0,42 g) en diclorometano anhidro en presencia de trietilamina (210 μ l) y se enfría la solución (0°C), se añaden luego 430 μ l de fosgeno y se deja durante 18 h bajo agitación a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla de reacción con diclorometano y se lava con una solución diluida de HCl y después con agua. Se concentra la fase orgánica y se purifica el residuo por cromatografía en columna de sílice (15-50% AcOEt/hexano).

Rendimiento 0,33 g (76%).
CCM (Sílice) Rf = 0,46 (50% AcOEt/hexano).
[α]_D = -16,3 (c=1, CHCl₃).

Ejemplo 6: Síntesis del 2,3-O-carbonato-1-fosfato-D-*mio*-inositol (compuesto 7)

Se hidrogena el compuesto 6 del ejemplo 5 (0,2 g) en una mezcla THF/EtOH/H₂O durante 5 h en presencia de un catalizador de paladio al 10% sobre carbón (0,2 g) a temperatura ambiente. Tras filtración sobre Celite, se liofiliza el filtrado.

Rendimiento 65 mg (100%).
HPLC (ODS; gradiente (10 min.) 0-2% ACN/TEAAc 30 mM, pH 6,8): Rt = 4,52 min. SM-ESI (-): m/z = 285 [M-H]⁻.
RMN-³¹P (D₂O): δ (ppm) = 3,54.

Ejemplo 7: Síntesis de los derivados 3-O-(5-benciloxicarbamidopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 8) («isómero 3») y 2-O-(5-benciloxicarbamidopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 9) («isómero 2»).

Se hace reaccionar el compuesto 7 del ejemplo 6 (60 mg) con 150 mg de 5-benciloxicarbamidopentilamina (derivado mono-Boc de la pentilamina) en 1,8 ml de DMF anhidra. Después de 48 h, se evapora el solvente y se purifica el producto por HPLC preparatoria para separar los compuestos 8 y 9.

Rendimiento en compuesto 8 (isómero 3): 40 mg (35%), en compuesto 9 (isómero 2): 37 mg (34%).
HPLC (ODS; gradiente (10 min.) 0-2% y luego (15 min.) 2-60% ACN/TEAAc 30 mM, pH 6,8): Rt = 18,6 min. (isómero 2).
RMN-³¹P (D₂O): δ ppm = 2,35.

Ejemplo 8: Síntesis de los derivados 3-O-(5-aminopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 10) o 2-O-(5-aminopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 11)

Se disuelven 21 mg del compuesto 8 o del compuesto 9 del ejemplo 7 en 2 ml de una mezcla etanol/agua (1/1) y se hidrogenan durante 5 h en presencia de un catalizador de paladio al 10% sobre carbón (0,2 g) a temperatura ambiente. Tras filtración sobre Celite, se liofiliza el filtrado.

Rendimiento en compuestos 10 ó 11: 15 mg (90%).
Compuesto 10: HPLC (ODS; gradiente (10 min.) 0-2% ACN/TEAAc 30 mM, pH 6,8): Rt = 3,75 min.

El compuesto 10 es el 3-O-(5-aminopentilcarbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (en forma de sal de trietilamonio).

HPLC (ODS; gradiente (10 min.) 0-2% ACN/TEAAc 30 mM, pH 6,8): Rt = 3,75 min. SM-ESI (-): m/z = 387 [M-H]⁻. SM-ESI (+): m/z = 389 [M-H]⁺.
RMN-³¹P (D₂O): δ ppm = 3,79.
RMN-¹H: (D₂O, 400 MHz (ppm)): 5,21 (dd, 1H, H₂); 3,97 (ddd, 1H, H₁); 3,76-3,57 (m, 2H, H₃+H₆); 3,50 (dd, 1H, H₄); 3,29 (m, 1H, H₅); 3,19-2,96 (m, 8H, CH₂ (brazo) + CH₂ (Et₃N)); 2,90 (dd, 2H, CH₂ (brazo)); 1,59 (m, 2H, CH₂ (brazo)); 1,47 (m, 2H, CH₂ (brazo)); 1,34 (m, 2H, CH₂ (brazo)); 1,18 (t, 9H, CH₃ (Et₃N)).
RMN-¹³C: (D₂O, 62,9 MHz (ppm)): 161,0 (C=O); 77,2 (C2), 76,9 (C5); 76,0 (C1); 75,3 (C3); 75,1 (C4); 72,5 (C6); 42,8, 42,2, 31,0, 29,1 y 25,5 (CH₂ brazo).

El compuesto 11 es el 2-O-(5-aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato (en forma de sal de trietilamonio).

HPLC (ODS; isocrático 2 min. al 5% y luego gradiente (20 min.) 5-45% ACN/TEAAc 30 mM, pH 6,8): Rt = 3,84 min.
SM-ESI (-): m/z = 387 [M-H]⁻. SM-ESI (+): m/z = 389 [M+H]⁺.
RMN-¹H: (D₂O, 400 MHz (ppm)): 4,52 (dd, 1H, H₃); 4,24 (dd, 1H, H₂); 3,88 (ddd, 1H, H₁); 3,71-3,68 (m, 2H, H₄ y H₆); 3,33 (m, 1H, H₅); 3,11-2,06 (m, 5H, CH₂ (brazo) + CH₂ (Et₃N)); 2,90 (dd, 2H, CH₂ (brazo)); 1,58 (m, 2H, CH₂ (brazo)); 1,46 (m, 2H, CH₂ (brazo)); 1,31 (m, 2H, CH₂ (brazo)); 1,18 (t, 9H, CH₃ (Et₃N)).
RMN-¹³C: (D₂O, 62,9 MHz (ppm)): 160,4 (C=O); 77,2 -76,6 -75,7 -74,8 -73,1 -72,5 (C inositol); 42,8, 42,1, 31,0, 29,1, y 25,4 (CH₂ brazo).
RMN-³¹P (D₂O): δ ppm = 2,31.

Ejemplo 9: Síntesis de un derivado 3-O-(5-biotinamidopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 12)

A una solución de 2,35 mg (5,23 μmol) de 3-O-(5-aminopentil)carbamoil-1-fosfato-D-*mio*-inositol (compuesto 10) preparado según el ejemplo 8 en 500 μl de tampón fosfato a pH 8, se le añaden 1,92 mg (5,6 μmol) de éster biotina-NHS (Aldrich) en una mezcla de 200 μl de tampón fosfato y 300 μl de acetonitrilo. Por HPLC, se observa la transformación del pico de producto de partida (tR = 16,5 min.) en un nuevo compuesto (tR = 16,9 min.) [Lichrospher Merck RP18 E (5 μm) 125 x 4 mm, 1 ml/min., A: agua con un 0,05% de TFA, B: acetonitrilo, gradiente de 0 a 2% de B en 10 min., de 2% a 15% de B en 5 min., de 15% a 100% de B en 8 min., detección a 190 nm]. Se purifica el compuesto por RP-HPLC; tras evaporación y secado a vacío, se obtienen 2,29 mg (70%) de derivado IP1-biotina (compuesto). SM (ES⁺) [MH]⁺ = 615 (100%) (Calc: C₂₂H₃₉N₄O₁₂PS).

Ejemplo 10: Marcaje del 3-O-(5-aminopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato con CY5: conjugado CY5-IP1 (compuesto 13)

En un eppendorff, se pesan 0,96 mg (1,96 μmol) de 3-O-(5-aminopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 10) preparado según el ejemplo 8 y se añaden 400 μl de tampón carbonato a pH 9 y luego 2 equivalentes de CY5-sulfonado-mono NHS (Amersham-Pharmacia) en 163 μl de DMF. Se analiza y purifica por RP-HPLC (Vydac RP18; 1 ml/min.; gradiente (30 min.) 10-27% ACN/H₂O con un 1% de TFA); se recoge el pico a tR ~17 min. Se obtienen 0,64 μmoles de compuesto 13.

Rendimiento = 32%.

Ejemplo 11: Preparación del 3-O-(4-carboxibutiramido-5-pentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 31) y del derivado N-hidroxisuccinimida (compuesto 32) (Figura 5)

En un tubo eppendorff, se pesan 2 mg (4,0 μ mol) de 3-O-(5-aminopentil)carbamido-1-fosfato-D-*mio*-inositol (compuesto 10) preparado según el ejemplo 8, se añaden 200 μ l de tampón bicarbonato de trietilamonio 0,1 M a pH 8 y 200 μ l (o sea, 5 equivalentes) de una solución de anhídrido glutárico en dimetilformamida (12 mg/ml); después de una hora de incubación, se lleva el pH a 10 añadiendo trietilamina y, después de 15 min., se evapora y neutraliza (pH 7) con ácido acético acuoso (al 20%, v/v). Se analiza y purifica por RP-HPLC (Vydac RP18; 1 ml/min.; gradiente (20 min.) 0-10% ACN/50 mM bicarbonato de trietilamonio) con detector de difusión de la luz. Se recoge la fracción correspondiente al pico mayoritario, se evapora la fracción a sequedad (speed-vac) y se coevapora luego varias veces añadiendo cada vez 200 μ l de agua. Se obtienen 3,0 μ moles de compuesto 31.

Rendimiento = 75%.

Se recoge el compuesto 31 así obtenido y evaporado a sequedad en un tubo eppendorff con DMF (200 μ l) que contiene 1,75 μ l de diisopropiletilamina, se añaden 1,3 mg de TSTU [tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio] disuelto en 200 μ l de DMF. Se sigue la formación del derivado NHS por RP-HPLC (Vydac RP18; 1 ml/min.; gradiente (20 min.) 0-10% ACN/ácido trifluoroacético al 0,1% en agua, detección a 190 nm). Después de 4 h de reacción, se evapora una parte de la DMF (speed-vac) y se diluye el medio de reacción con una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% (aproximadamente 3 ml) y se purifica por RP-HPLC utilizando las mismas condiciones que para el análisis. Se recoge la fracción principal y se la evapora a sequedad y seca a vacío. Se obtienen 1,5 μ moles de derivado NHS (32). Se recoge este compuesto en un mínimo de agua, se alicuota en tubos eppendorff provistos de tapones de rosca y se evapora a sequedad. Se guardan los tubos a -20°C hasta su utilización.

Ejemplo 12: Síntesis de un derivado 3-O-[5-(3-maleimidopropionamido)pentil]carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 33) (Figura 5)

A una solución de 4,04 mg (9 μ mol) de 3-O-(5-aminopentil)carbamoil-1-fosfato-D-*mio*-inositol (compuesto 10) preparado según el ejemplo 8 en 2 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7 enfriado en un baño de hielo, se le añaden 5,54 mg (20 μ mol) de 3-maleimidopropionato de N-hidroxisuccinimidilo (Aldrich) disueltos en 400 μ l de acetonitrilo en fracciones de 100 μ l cada 5 min., dejando regresar a 20°C, y luego se deja dos horas en reacción. Por HPLC, se observa la transformación del pico de producto de partida en un nuevo compuesto (tR = 12,7 min.) [Lichrospher Merck RP18 E (5 μ m) 125 x 4 mm, 1 ml/min., A: agua con un 0,05% de TFA, B: acetonitrilo, gradiente de 0 a 2% de B en 10 min., de 2% a 15% de B en 5 min. y de 15% a 100% de B en 8 min., detección a 190 nm]. Se purifica el compuesto por RP-HPLC utilizando los mismos solventes; tras evaporación y secado a vacío, se obtienen 1,15 mg (21%) de derivado IP1-maleimida (compuesto 33). SM (ES⁺) [MH]⁺ = 420 (30%) [M+Na]⁺ = 562 (50%) (Calc.: C₁₉H₃₀N₃O₁₃P). Se alicuota el producto y se conserva a -20°C hasta su utilización.

Ejemplo 13: Copulación del IP1-maleimida con XL665

Se activa previamente alofococianina XL665 (CIS BIO INTERNATIONAL) con 5 equivalentes de SPDP (3-[2-piridiltio]propionato de N-hidroxisuccinimidilo) en un tampón fosfato 0,1 M a pH=7 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se reduce entonces la mezcla de reacción con 20 mM de DTT (ditiotretitol) en el mismo tampón. Se purifica luego la XL665 activada (XL665-SH) por cromatografía de exclusión utilizando una columna Amersham Biosciences de G25 súper fina HR10/30. El tampón de elución de la etapa de purificación es un tampón fosfato 0,1 M a pH=7.

La etapa de copulación es llevada a cabo añadiendo 5 equivalentes de IP1-maleimida del ejemplo 12 a 1 equivalente de XL665-SH y dejando reaccionar durante una noche a 4°C.

Se purifica luego el conjugado IP1-XL665 por cromatografía de exclusión utilizando una columna G25 súper fina HR10/30 (Amersham Biosciences). El tampón de elución de la etapa de purificación es un tampón fosfato 0,1 M a pH=7.

Ejemplo 14: Preparación de un inmunógeno por copulación entre BSA y 3-O-(5-aminopentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato.

Se prepara una solución de BSA (seroalbúmina bovina) a razón de 10 mg/ml en PBS (tampón fosfato salino: 11 mM de fosfato, 140 mM de NaCl, pH 7,2). En un tubo eppendorff, se mezclan: 240 μ l de solución de BSA (o sea, 2,4 mg)

y 300 μl de análogo de 3-O-(5-aminopentil)carbamido-1-fosfato-D-*mio*-inositol preparado según el ejemplo 8, y luego 60 μl de glutaraldehído (o sea, un 1% del volumen final). Se incuba durante dos horas a 20°C bajo agitación, se añaden luego 600 μl de una solución acuosa de NaBH_4 (borohidruro de sodio) recién preparada y se dializa después durante una noche a 4°C contra tampón PBS. Se alicuota entonces el conjugado y se conserva a -20°C.

5

Ejemplo 15: Inmunización

Se inmunizan ratones (6 inyecciones subcutáneas realizadas cada una de ellas a partir de 50 μl de solución de inmunógeno preparado según el ejemplo 14 emulsionado mediante un mismo volumen de adyuvante de Freund). Se efectúan regularmente recogidas de sangre y se conservan los antisueros obtenidos a -20°C.

10

Ejemplo 16: Ensayo ELISA que permite detectar la presencia de anticuerpos que reconocen específicamente el IP1

Se utilizan placas de microtitulación de 96 pocillos NUNC recubiertas de estreptavidina (13 pmol/pocillo). Se distribuyen 100 μl de conjugado IP1-biotina preparado según el ejemplo 9 a una concentración de 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón PBS con un 0,3% de BSA. Incubación 1 h 30 a 20°C y luego tres lavados con PBS con un 0,1% de Tween 20. Se recogen los antisueros, que se diluyen a 1/10, 1/100 ... 1/10.000 y se distribuyen (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) en la placa de microtitulación; se preparan también pocillos control «blancos» distribuyendo tampón solo. Incubación 16 h a 4°C y luego tres lavados con PBS con un 0,1% de Tween 20. Se distribuyen 100 μl de conjugado anti-IgG (ratón)-Peroxidasa (Sigma # A 0168) diluido a 1/60.000 en PBS con un 0,3% de BSA. Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y se efectúan después tres lavados con PBS con un 0,1% de Tween. Se distribuyen 100 μl de TMB (Sigma # T 8665), se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación, se distribuyen después 100 μl de reactivo de parada (Sigma # S5814) y se miden las densidades ópticas a 450 nm.

15

20

25

Se observan $\text{DO}_{450 \text{ nm}} > 0,5$ en los pocillos que contienen las diluciones de sueros inferiores a 1/10.000, lo que muestra la presencia en estos sueros de anticuerpos de ratón dirigidos contra el análogo de IP1.

Ejemplo 17: Especificidad de los anticuerpos anti-IP1 evaluados por ELISA (Figura 10)

Se utilizan placas de microtitulación de 96 pocillos NUNC recubiertas de estreptavidina (13 pmol/pocillo). Se distribuyen 100 μl de conjugado IP1-biotina preparado según el ejemplo 9 a una concentración de 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incuba durante 2 h 30 a temperatura ambiente con agitación. Se lava tres veces con agua con un 0,1% de Tween 20. Se añaden 50 μl de soluciones de competidores para preparar las gamas de concentraciones finales siguientes: *mio*-inositol (de 10 nM a 1 mM), IP1 Sigma (de 1 nM a 100 μM), IP2 (de 1 nM a 100 μM), IP3 (de 1 nM a 100 μM) y PiP2 (de 1 nM a 100 μM), así como 50 μl de sobrenadantes de cultivo que segregan anticuerpos anti-IP1. Se incuba durante 16 h a 4°C y se lava después tres veces con agua con un 0,1% de Tween 20. Se añaden 100 μl de conjugado anti-IgG (ratón)-Peroxidasa (Sigma # A 0168) diluido a 1/60.000 en PBS con un 0,3% de BSA. Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente con agitación y se efectúan después tres lavados con PBS con un 0,1% de Tween 20. Se distribuyen 100 μl de substrato TMB (Sigma # T 8665), se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación, se distribuyen luego 100 μl de reactivo de parada (Sigma # S5814) y se miden las densidades ópticas a 450 nm.

30

35

40

Se lleva la densidad óptica a 450 nm en función del logaritmo de la concentración de compuesto del que se quiere estudiar la competición. Para todos los compuestos estudiados en competición, se observa la densidad óptica máxima $\text{DO}_{450} \sim 1,5$ a las concentraciones más bajas (1 nM). Se observa que el *mio*-inositol no provoca disminución de la señal incluso a concentraciones de 1 mM, mientras que el IP1 induce una disminución de la señal para concentraciones inferiores a la micromolar, lo que muestra que el anticuerpo contenido en el suero es capaz de reconocer específicamente la molécula de IP1, presentando una afinidad suficiente para ser utilizado en una titulación. Del mismo modo, se estudiaron los diferentes metabolitos, tales como el PiP2, y no son reconocidos por el anticuerpo, lo que confirma la especificidad del reconocimiento de IP1 por los anticuerpos anti-IP1.

45

50

El gráfico de la Figura 11 muestra la especificidad del anticuerpo anti-IP1 utilizado en el ensayo ELISA. En efecto, sólo la utilización del IP1 como competidor permite medir una inhibición de la señal.

55

Ejemplo 18: Titulación de IP1 mediante un ensayo HTRF. Especificidad de los anticuerpos anti-IP1.

Todas las soluciones son preparadas en tampón HEPES 100 mM a pH 7, 0,1% BSA, 0,4 M KF.NB. En los pocillos de una placa de microtitulación de fondo negro, se distribuyen 50 μl de solución de competidores para obtener las concentraciones finales siguientes: *mio*-inositol (de 10 nM a 1 mM), IP1 Sigma (de 1 nM a 1 mM), IP2 (de 1 nM a 100 μM), IP3 (de 1 nM a 100 μM) y PiP2 (de 1 nM a 100 μM). Se distribuyen entonces en el orden indicado 50 μl de una solución 10 nM de conjugado IP1-CY5 del ejemplo 10 y 50 μl de una solución que contiene 1,5 nM de un anticuerpo anti-IP1 previamente marcado con criptato de europio. Se distribuyen igualmente dos pocillos en los

60

cuales se reemplazan los 50 μ l de competidores por 50 μ l de tampón para constituir blancos (controles negativos). Se incuba durante 2 h a 4°C y se efectúa una medición de fluorescencia en tiempo resuelto ($t_d = 50 \mu$ s, $t_g = 400 \mu$ s) a 620 nm y 665 nm en un aparato Rubystar® (BMG Labtech). Se calculan los valores de ΔF sirviéndose de los valores de los blancos como referencia. Se calculan entonces los porcentajes de inhibición obtenidos con los diferentes competidores con los valores de delta F tomando como valor del 100% la señal obtenida en presencia de un exceso del competidor IP1. El gráfico de la Figura 12 muestra la gran especificidad del anticuerpo anti-IP1 utilizado. En efecto, sólo la utilización del IP1 como competidor permite medir una inhibición de la señal.

El conjugado según el ejemplo 13 puede ser utilizado del mismo modo que el conjugado IP1-CY5 en un ensayo HTRF.

Ejemplo 19: Síntesis de los derivados 4-O-(5-aminopentilcarbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 18D) o 5-O-(5-aminopentilcarbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 19D)

Se trata *mio*-inositol comercial (compuesto 1) con 1,1-dietoxiciclohexano según el protocolo de Dreef *et al.* (Tetrahedron, 1991, 47 (26), 4709-4722) purificando directamente la mezcla de reacción y sin realizar el tratamiento ácido adicional (destinado a aumentar la proporción del isómero 1,2:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol); se obtienen así un 28% de isómero 1,2:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol, un 47% de isómero 2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol (34) y un 18% de isómero 1,2:5,6-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol.

1-O-Butiril-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol (36) y 6-O-butiril-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol (37):

Se suspende el compuesto 34 (37 g, 11 mmoles) en tolueno (250 ml) y se añade luego óxido de dibutylestaño (30 g, 12 mmoles). Se lleva la mezcla a reflujo en el Dean Stark durante 3 horas. Se concentra a continuación la solución a vacío. Se recoge entonces el residuo en 200 ml de DMF anhidra. Se enfría esta solución a -40°C y se añaden fluoruro de cesio (34 g, 22 mmoles) y cloruro de butirilo (12 ml, 11,6 mmoles). Se agita el medio de reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluye la mezcla de reacción con 600 ml de diclorometano y se lava con 400 ml de agua. Se seca la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se filtra y se concentra después. Se obtienen los compuestos 36 (27,6 g, 62%) y 37 (3,6 g, 8%) puros por cromatografía en gel de sílice (hexano/acetato de etilo, 4/1).

$R_f = 0,33$ (37) y $0,21$ (36) (hexano/acetato de etilo, 4/1). 36: RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, δ (ppm)): 4,98 (t, 1H, H_1 , $J_{1-2} = J_{1-6} = 4,6$ Hz); 4,59 (dd, 1H, H_2 , $J_{2-3} = 6,1$ Hz); 4,36 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-4} = 8,1$ Hz); 4,09 (dd, 1H, H_6 , $J_{5-6} = 9,0$ Hz); 3,87 (dd, 1H, H_4 , $J_{4-5} = 10,5$ Hz); 3,47 (dd, 1H, H_5); 2,44-2,32 (m, 4H, 2^*CH_2); 1,78-1,33 (m, 20H, 10^*CH_2 de ciclohexilideno); 0,99 (t, 3H, CH_3 , $J = 7,4$ Hz).

37: RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, δ (ppm)): 5,21 (dd, 1H, H_6 , $J_{1-6} = 2,9$, $J_{5-6} = 8,7$ Hz); 4,46 (dd, 1H, H_2 , $J_{1-2} = 3,9$, $J_{2-3} = 7,1$ Hz); 4,39 (dd, 1H, H_3 , $J_{3-4} = 7,7$ Hz); 4,20 (dd, 1H, H_4 , $J_{4-5} = 10,6$ Hz); 3,89 (dd, 1H, H_1); 3,61 (dd, 1H, H_5); 2,40-2,32 (m, 4H, 2^*CH_2); 1,79-1,24 (m, 20H, 10^*CH_2 de ciclohexilideno); 0,99 (t, 3H, CH_3).

1-O-Butiril-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-D-*mio*-inositol (36D)

Se disuelve 1-butiril-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-*mio*-inositol 36 (18 g, 43,9 mmoles) en una mezcla hexano/éter (200 ml, 10/1) y tampón fosfato 0,1 M (pH~7, 90 ml). Se añade lipasa pancreática porcina (PLL) (54 g) y se deja el medio de reacción en agitación a 37°C durante 1 semana. Se deja decantar el medio. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga el resto. Se separa el sobrenadante de la pella. Se juntan los sobrenadantes, se secan sobre MgSO_4 , se filtran y se concentran después. Se separan el diol 34L (4,7 g, 65%) y el éster 36D (8,9 g, 98%) y se obtienen puros por cromatografía en gel de sílice (columna abierta, hexano/acetato de etilo, 4/1→1/1).

$R_f = 0,73$ (36D) y $0,35$ (34L) (hexano/acetato de etilo, 1/1).

$[\alpha]_D = -8,3$ ($c=1,06$, CHCl_3) (36D).

$[\alpha]_D = -16,47$ ($c=0,61$, CHCl_3) (34L).

2,3:4,5-Di-O-ciclohexiliden-D-*mio*-inositol (34D)

Se disuelve el compuesto 36D (8,9 g, 21,7 mmoles) en metanol (70 ml). Se añaden gota a gota 45 ml de una solución de sosa 5 M. Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Se evapora el metanol a presión reducida y se diluye el residuo con 200 ml de diclorometano. Se extrae la fase acuosa con 200 ml de acetato de etilo. Se juntan y concentran las fases orgánicas. Se obtiene el compuesto 34D (6,8 g, 92%) puro por cromatografía en gel de sílice (columna abierta, depósito sólido, H/A, 1/1).

Rendimiento = 92%. $R_f = 0,35$ (hexano/acetato de etilo, 1/1).

6-O-Bencil-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-D-*mio*-inositol (37D)

Se suspende el compuesto 34D (1 g, 2,9 mmoles) en tolueno (28 ml) y se añade luego óxido de dibutilestaño (0,8 g, 3,2 mmoles). Se lleva la mezcla a reflujo en el Dean Stark durante 3 horas. A continuación, se concentra la solución a vacío. Se recoge entonces el residuo en 16 ml de DMF anhidra. Se enfría esta solución a -20°C y se añaden fluoruro de cesio (0,9 g, 5,8 mmoles) y bromuro de bencilo (0,25 ml, 2,9 mmoles). Se agita el medio de reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluye la mezcla de reacción con 60 ml de diclorometano y se lava con 30 ml de agua. Se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra después a vacío impulsado. Se obtiene el compuesto 37D (0,96 g, 76%) puro por cromatografía en gel de sílice (columna abierta, hexano/acetato de etilo, 1/1).

Rendimiento = 76%.

6-O-Bencil-2,3:4,5-di-O-ciclohexiliden-5-O-(*o*-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol (38D)

Se disuelve el compuesto 37D (0,83 g, 1,93 mmoles) en 45 ml de diclorometano anhidro. Se añaden *o*-xililen-N,N'-diisopropilfosforamidita (1,03 g, 3,86 mmoles) y 1-H-tetrazol (0,338 g, 4,83 mmoles). Se deja el medio bajo agitación a temperatura ambiente bajo argón durante 1 hora. Se enfría entonces el medio a 0°C y se añaden gota a gota 0,36 ml de hidroperóxido de terc-butilo. Se deja que la mezcla de reacción regrese a temperatura ambiente y se lava después con 20 ml de agua. Se seca la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra. Se obtiene el producto 38D (980 mg) puro por cromatografía en gel de sílice (columna abierta, hexano/acetato de etilo, 7/3→1/1).

Rendimiento = 83%.

Rf = 0,45 (hexano/acetato de etilo, 1/1).

Punto de fusión: 59°C.

RMN-³¹P (CDCl₃, 161,98 MHz, δ (ppm)): -1,48.

RMN-¹³C (CDCl₃, 100,62 MHz, δ (ppm)): 138,2 + 135,7 (Cipso); 129,6-128,1 (Caro); 113,7 + 112,4 (Cipso); 79,6 (C₆); 78,6 (C₅); 77,9 (C₁); 77,6 (C₄); 76,5 (C₃); 74,4 (C₂, J_{C-P} = 5,1 Hz); 72,4 (CH₂Ph); 68,9 (CH₂Ph, J_{C-P} = 3,7 Hz); 37,0 + 36,9 + 36,7 + 34,6 + 25,5 + 25,4 + 24,3 + 24,2 + 24,1 + 23,9 (C_{ciclo}).

6-O-Bencil-2,3-O-ciclohexiliden-5-O-(*o*-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol (39D)

Se disuelve el producto 38D (0,98 g, 1,6 mmoles) en 20 ml de una solución 0,1 M de etilenglicol en diclorometano. Se añade ácido para-toluensulfónico (0,13 g). Se neutraliza el medio de reacción al cabo de 2 horas por adición de trietilamina y se concentra a presión reducida. Se purifica el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice (columna abierta, depósito en CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, elución CH₂Cl₂/MeOH, 99/1→95/5), para obtener el compuesto 39D (0,357 g, 42%) obtenido en forma de una goma.

Rf = 0,6 (acetato de etilo puro).

RMN-¹H (acetona D₆, 400 MHz, δ (ppm)): 7,50-7,17 (m, 9H, Haro); 5,46 (dd, 1H, CH₂OP, J_{AB} = 13,5, J_{H-P} = 16,5 Hz); 5,42 (dd, 1H, CH₂OP, J_{AB} = 13,5, J_{H-P} = 16,5 Hz); 5,14-4,90 (m, 3H, 2*H de CH₂OP + H de CH₂Ph); 4,82 (d, 1H, CH₂Ph, J = 11,1 Hz); 4,80 (ddd, 1H, H₁, J₁₋₂ = 4,2, J₁₋₆ = 8,4, J_{1-P} = 7,8 Hz); 4,66 (dd, 1H, H₂, J₂₋₃ = 5,5 Hz); 4,20 (dd, 1H, H₃, J₃₋₄ = 7,0 Hz); 3,91 (dd, 1H, H₆, J₅₋₆ = J₁₋₆ = 8,4 Hz); 3,78 (dd, 1H, H₄, J₄₋₅ = 9,2 Hz); 3,58 (dd, 1H, H₅); 1,81-1,36 (m, 10H, 5*CH₂ de ciclohexilideno).

RMN-³¹P (acetona D₆, 161,98 MHz, δ (ppm)): -4,11.

6-O-Bencil-4,5-carbonato-2,3-O-ciclohexiliden-5-O-(*o*-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol (40D)

Se disuelve el diol (39D) (0,13 g, 0,24 mmoles) en 3 ml de diclorometano anhidro. Se añade 1,1'-carbonildiimidazol (120 mg, 0,72 mmoles). Se deja la mezcla de reacción bajo agitación bajo argón durante toda la noche. Se concentra la solución. Se purifica el residuo obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice (columna abierta, hexano/acetato de etilo, 7/3→100% acetato de etilo), para obtener el compuesto 40D en forma de una goma blanca (118 mg, 87%).

Rf = 0,63 (hexano/acetato de etilo, 3/7).

[α]_D = -6,1 (c=0,97, CHCl₃) (40D).

RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ (ppm)): 7,47-7,22 (m, 9H, Haro); 5,30 (dd, 1H, CH₂OP, J_{AB} = 13,6, J_{H-P} = 16,6 Hz); 5,25 (dd, 1H, CH₂OP, J_{AB} = 13,6, J_{H-P} = 16,6 Hz); 5,24 (dd, 1H, CH₂OP); 5,10 (dd, 1H, CH₂OP); 4,84 (td, 1H, H₁, J₁₋₂ = 3,0, J₁₋₆ = 2,2, J_{1-P} = 8,8 Hz); 4,79 (d, 1H, CH₂ de bencilo, J_{AB} = 11,8 Hz); 4,71 (d, 1H, CH₂ de bencilo); 4,65-4,52 (m, 3H, H₂ + H₃ + H₄); 4,26 (dd, 1H, H₆, J₅₋₆ = 8,0, J₁₋₆ = 2,2 Hz); 4,15 (m, 1H, H₅); 1,80-1,21 (m, 10H, 5*CH₂ de ciclohexilideno).

RMN-³¹P (CDCl₃, 161,98 MHz, δ (ppm)): -1,49.
IR: 1812-1840 (C=O); 1284 (P=O); 1007-1021-1091 (P-O).

5 4-O-(5-Aminopentilcarbamoil)-6-O-bencil-2,3-O-ciclohexiliden-1-O-(o-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol "isómero 4 en forma protegida" (41D) y 5-O-(5-aminopentilcarbamoil)-6-O-bencil-2,3-O-ciclohexiliden-1-O-(o-xililendioxifosforil)-D-*mio*-inositol "isómero 5 en forma protegida" (42D): Se disuelve el compuesto 40D (115 mg, 0,21 mmoles) en 3 ml de diclorometano anhidro y se añade luego gota a gota 5-benciloxicarbamidopentilamina (derivado mono-Boc de la pentilamina como en el ejemplo 7) (153 mg, 0,65 mmoles) previamente disuelta en 2 ml de diclorometano anhidro. Se deja evolucionar a la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. Se concentra la solución. Se purifica el residuo por cromatografía en gel de sílice (columna abierta, hexano/acetato de etilo, 1/4→100% acetato de etilo), para obtener los compuestos 41D (78 mg, 40%) y 42D (78 mg, 40%).

15 41D: RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ (ppm)): 7,43-7,17 (m, 19H, Haro); 5,36 (dd, 1H, CH₂OP, J_{AB} = 13,6, J_{H-P} = 12,1 Hz); 5,27 (dd, 1H, CH₂OP, J_{AB} = 13,6, J_{H-P} = 16,6 Hz); 5,18-4,80 (m, 8H, 2*H de CH₂OP + 4*H de CH₂Ph + H₄ + H₁); 4,71-4,66 (m, 1H, H₂); 4,15 (dd, 1H, H₃, J₂₋₃ = J₃₋₄ = 6,8 Hz); 3,97 (dd, 1H, H₆, J₅₋₆ = 8,1 Hz); 3,60 (dd, 1H, H₅, J₄₋₅ = 8,1 Hz); 3,31-3,11 (m, 4H, 2*CH₂N); 1,92-1,31 (m, 16H, 3* CH₂ del brazo + 5*CH₂ de ciclohexilideno).
RMN-³¹P (CDCl₃, 161,98 MHz, δ (ppm)): -1,76.

20 4-O-(5-Aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato (18D)

25 Se agita una solución del compuesto 41D (75 mg, 0,094 mmoles) en 16 ml de una mezcla metanol-cloroformo (v/v) bajo atmósfera de hidrógeno en presencia de paladio sobre carbón al 10% (80 mg) a temperatura ambiente durante 68 horas bajo 10 bares. Tras filtración sobre Celite y lavado con agua, se evapora el filtrado, se recoge luego con agua y se liofiliza, para obtener el compuesto 18D (18 mg, 53%).

30 RMN-¹H (D₂O, 400 MHz, δ (ppm)): 4,81 (dd, 1H, H₄); 4,20 (s ancho, 1H, H₂); 3,87 (dd, 1H, H₁); 3,78 (dd, 1H, H₆); 3,68 (dd, 1H, H₃); 3,43 (dd, 1H, H₅); 3,20-3,05 (m, 2H, 2*H de CH₂-N); 2,91 (t, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 7,4 Hz); 1,63 (c, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 7,5 Hz); 1,50 (c, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 6,9 Hz); 1,37 (m, 2H, 2*H de CH₂-N).

RMN-³¹P (D₂O, 161,98 MHz, δ (ppm)): 3,98.

SM-ESI (-): *m/z* 387 [M-H].

5-O-(5-Aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato (19D)

35 Se agita una solución del compuesto 13D (58 mg, 73 μmol) en 16 ml de una mezcla metanol/cloroformo (v/v) en presencia de paladio sobre carbón al 10% (60 mg) a temperatura ambiente durante 68 horas bajo 10 bares. Tras filtración sobre Celite y lavado con agua, se evapora el filtrado, se recoge luego con agua y se liofiliza, para obtener el compuesto 16D.

40 RMN-¹H (D₂O, 400 MHz, δ (ppm)): 4,50 (dd, 1H, H₅, J₄₋₅ = 9,8, J₅₋₆ = 9,6 Hz); 4,17 (s ancho, 1H, H₂); 3,91 (dd, 1H, H₁, J₁₋₆ = 9,6 Hz); 3,78 (dd, 1H, H₆); 3,67 (dd, 1H, H₄, J₃₋₄ = 10,0 Hz); 3,57 (dd, 1H, H₃, J₂₋₃ = 2,1 Hz); 3,20-3,05 (m, 2H, 2*H de CH₂-N); 2,91 (t, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 7,4 Hz); 1,59 (c, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 7,7 Hz); 1,47 (c, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 6,9 Hz); 1,32 (m, 2H, 2*H de CH₂-N).

RMN-³¹P (D₂O, 161,98 MHz, δ (ppm)): 3,75.

45 SM-ESI (-): *m/z* 387 [M-H].

5-O-(5-Aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato (19 D)

50 Se agita una solución del compuesto 42D (58 mg, 73 μmol) en 16 ml de una mezcla metanol/cloroformo (v/v) en presencia de paladio sobre carbón al 10% (60 mg) a temperatura ambiente durante 68 horas bajo 10 bares. Tras filtración sobre Celite y lavado con metanol y luego agua, se evapora el filtrado, se recoge después con agua y se liofiliza, para obtener el compuesto 19D.

55 RMN-¹H (D₂O, 400 MHz, δ (ppm)): 4,50 (dd, 1H, H₅, J₄₋₅ = 9,8, J₅₋₆ = 9,6 Hz); 4,17 (s ancho, 1H, H₂); 3,91 (dd, 1H, H₁, J₁₋₆ = 9,6 Hz); 3,78 (dd, 1H, H₆); 3,67 (dd, 1H, H₄, J₃₋₄ = 10,0 Hz); 3,57 (dd, 1H, H₃, J₂₋₃ = 2,1 Hz); 3,20-3,05 (m, 2H, 2*H de CH₂-N); 2,91 (t, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 7,4 Hz); 1,59 (c, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 7,7 Hz); 1,47 (c, 2H, 2*H de CH₂-N, J = 6,9 Hz); 1,32 (m, 2H, 2*H de CH₂-N).

RMN-³¹P (D₂O, 161,98 MHz, δ (ppm)): 3,75.

SM-ESI (-): *m/z* 387 [M-H].

60 **Ejemplo 20:** Síntesis de los derivados 4-O-(5-biotinamidopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 43D)

A una solución de 1 mg (2,58 μmol) de 4-O-(5-aminopentilcarbamoil)-1-fosfato-D-*mio*-inositol (compuesto 18D,

preparado según el ejemplo 19) en 400 μ l de tampón HEPES a pH 8, se le añaden 1,75 mg (5,16 μ mol) de éster biotina-NHS (Aldrich) en 50 μ l de DMF. Se forma un precipitado, que se redissuelve tras adición de 450 μ l de acetonitrilo, y se deja bajo agitación durante 30 min. a temperatura ambiente. Por HPLC, se observa la desaparición del pico del producto de partida y la aparición de un nuevo compuesto que presenta un tiempo de retención de 29,2 min. [Chromolith Merck, 1,5 ml/min., A: agua con un 0,1% de TFA, B: acetonitrilo, gradiente de 0 a 5 min. 0% de B, 15 min. 2% de B, 30 min. 15% de B, 40 min. 30% de B; detección a 190 nm]. Se purifica el compuesto por RP-HPLC; tras evaporación y secado a vacío, se obtienen 1,2 mg (63%) del compuesto 43D.

Ejemplo 21: Síntesis de los derivados 5-O-(5-biotinamidopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato (compuesto 44D)

Se trata una solución de 5-O-(5-aminopentilcarbamoil)-1-fosfato-D-*mio*-inositol (compuesto 19D, preparado según el ejemplo 19) con éster biotina-NHS y se purifica después la mezcla de reacción por RP-HPLC como se describe en el ejemplo 20, para obtener así el compuesto 44D.

Ejemplo 22: Reparación de un inmunógeno por copulación entre BSA y 4-O-(5-aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato.

Siguiendo el protocolo del ejemplo 14, se prepara un conjugado entre BSA (seroalbúmina bovina) y el análogo 4-O-(5-aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato 18D (solución a razón de 1 mg/ml en PBS) preparado según el ejemplo 19. Se alicuota entonces el conjugado y se conserva a -20°C.

Ejemplo 23: Preparación de un inmunógeno por copulación entre BSA y 5-O-(5-aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato.

Siguiendo el protocolo del ejemplo 14, se prepara un conjugado entre BSA (seroalbúmina bovina) y el análogo 5-O-(5-aminopentilcarbamoil)-D-*mio*-inositol-1-fosfato 19D (solución a razón de 1 mg/ml en PBS) preparado según el ejemplo 19. Se alicuota entonces el conjugado y se conserva a -20°C.

Ejemplo 24: Titulación de IP1 tras estimulación de células CHO que expresan el receptor M1 con acetilcolina (agonista del receptor M1).

En una placa de cultivo opaca de 96 pocillos, se distribuyen 80.000 células CHO que expresan el receptor muscarínico M1, bajo 200 μ L de medio F12 complementado por un 10% de SVF, penicilina-estreptomina y aminoácidos no esenciales; se incuba durante una noche a 37°C con un 5% de CO₂. Se elimina el medio de cultivo y se distribuyen 50 μ L de soluciones de acetilcolina (agonista LM1, de 1 nM a 100 μ M) diluida en tampón KREBS (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4,2 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 g/l de glucosa, 30 mM LiCl). Se distribuyen igualmente seis pocillos en los cuales se reemplaza la acetilcolina por tampón, con el fin, por una parte, de determinar la señal negativa (3 pocillos) correspondiente al ruido de fondo, y por otra parte de determinar también la señal «basal» del ensayo (3 pocillos), es decir, la señal de TR-FRET en ausencia de estimulación. Se incuba durante 30 minutos a 37°C con un 5% de CO₂. Se distribuyen entonces 25 μ l de una solución 4 nM de anticuerpo anti-IP1 previamente marcado con criptato de europio (para tener 1 nM final en el ensayo) y luego 25 μ l de una solución 12 nM de IP1 marcado con el fluoróforo d2 (en adelante IP1-d2), para tener 3 nM finales en el ensayo. Se diluyen estos dos reactivos en tampón HEPES 50 mM a pH 7, 0,2% BSA, 0,8 M KF y 1% Tritón X100. En los pocillos que sirven para determinar la señal negativa, se reemplaza el IP1-d2 con tampón. Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente y se efectúa una medición de fluorescencia en tiempo resuelto (td = 50 μ s, tg = 400 μ s) a 620 nm y 665 nm (respectivamente, E620 y E665) en un aparato Rubystar® (BMG Labtech). A partir de los valores de intensidad de fluorescencia E620 y E665, se calcula la razón de intensidad E665/E620, denominada ratio, que se multiplica por 10.000 para mayor comodidad. Los valores de delta F son calculados con respecto a la ratio medida en un pocillo sin IP1-d2, correspondiente al ruido de fondo (señal basal, cf. G. Mathis, Clin. Chem. 39 (1993), 1953, y la solicitud WO92/13264). Se calculan los porcentajes de inhibición obtenidos en función de la estimulación del receptor a partir de los delta F, equivaliendo el delta F medido en el pocillo de «señal basal» sin fármaco al 0% de inhibición.

En ausencia de acetilcolina, se eleva la señal medida resultante de la transferencia de energía entre anticuerpo anti-IP1 marcado con criptato de europio y el IP1-d2. Cuando se estimula el receptor M1 con acetilcolina, se produce IP1 en la célula y la señal decrecerá en función de la concentración de acetilcolina (Figura 13A). Este resultado puede ser igualmente expresado calculando el porcentaje de inhibición de la señal basal (medida en ausencia de acetilcolina) inducida por la adición de una concentración creciente de acetilcolina. (Figura 13B).

Ejemplo 25: Titulación de IP1 tras estimulación de células CHO que expresan el receptor M1 con acetilcolina en presencia de atropina (antagonista del receptor M1).

En una placa de cultivo opaca de 96 pocillos, se distribuyen 80.000 células CHO que expresan el receptor

muscarínico M1, bajo 200 μL de medio F12 complementado por un 10% de SVF, penicilina-estreptomicina y aminoácidos no esenciales; se incuba durante una noche a 37°C con un 5% de CO_2 . Se elimina el medio de cultivo y se distribuyen 40 μL de soluciones de atropina (de 0,125 nM a 12,5 μM) diluida en tampón KREBS (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4,2 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1 g/l de glucosa, 30 mM LiCl) y se incuba durante 15 min. a 37°C con un 5% de CO_2 . Se distribuyen después 10 μl de solución de acetilcolina 3 μM en el mismo tampón KREBS. Se distribuyen también seis pocillos en los cuales se reemplazan la atropina y la acetilcolina por tampón, con el fin, por una parte, de determinar la señal negativa (3 pocillos) correspondiente al ruido de fondo, y por otra parte de determinar también la señal «basal» del ensayo (3 pocillos), es decir, la señal de TR-FRET en ausencia de estimulación. Se incuba durante 30 minutos a 37°C con un 5% de CO_2 . Se distribuyen entonces 25 μl de una solución 4 nM de anticuerpo anti-IP1 previamente marcado con criptato de europio (para tener 1 nM final en el ensayo) y luego 25 μl de una solución 12 nM de IP1-d2 (para tener 3 nM finales en el ensayo). Se diluyen estos dos reactivos en tampón HEPES 50 mM, pH 7, 0.2% de BSA, 0,8 M KF y 1% de Tritón X100. En los pocillos que sirven para determinar la señal negativa, se reemplaza el IP1-d2 por tampón. Se incuba durante 1 h a temperatura ambiente y se efectúa una medición de fluorescencia en tiempo resuelto ($t_d = 50\mu\text{s}$, $t_g = 400\mu\text{s}$) a 620 nm y 665 nm (respectivamente, E620 y E665) en un aparato Rubystar® (BMG Labtech). A partir de los valores de intensidad de fluorescencia E620 y E665, se calcula la razón de intensidad E665/E620, denominada ratio, que se multiplica por 10.000 para mayor comodidad. Se calculan los valores de delta F con respecto a la ratio medida en un pocillo sin IP1-d2 (señal negativa, cf. G. Mathis, Clin. Chem. 39 (1993), 1953, y la solicitud W092/13264). Se calculan los porcentajes de inhibición obtenidos en función de la estimulación del receptor a partir de los delta F, equivaliendo el delta F del punto basal sin fármaco al 0% de inhibición.

En presencia de una concentración creciente de antagonista M1 (atropina), se inhibirá la activación por el agonista M1 (acetilcolina). La célula producirá, por lo tanto, menos IP1 y aumentará la señal resultante de la transferencia de energía entre el anticuerpo anti-IP1 marcado con criptato de europio y el IP1-d2 (Figura 14A).

Este resultado puede ser también expresado calculando la evolución de la inhibición de la señal por la acetilcolina en presencia de concentraciones crecientes de atropina (Figura 14B).

Ejemplo 26: Titulación de IP1 en células HEK-293 que expresan de manera transitoria el receptor mGlu1, efecto de un modulador alostérico positivo (PAM).

En una placa de cultivo opaca de 96 pocillos, se distribuyen 100.000 células HEK-293 previamente transfectadas por electroporación para expresar el receptor mGluR1, bajo 100 μl de medio DMEM complementado por un 10% de SVF, penicilina-estreptomicina y aminoácidos no esenciales. Se incuba durante 3 h a 37°C con un 5% de CO_2 , saturado en humedad, antes de cambiar el medio por 100 μl de DMEM que contiene glutamax (glutamina no degradable a glutamato) y desprovisto de suero. Se incuba durante una noche a 37°C en una incubadora con un 5% de CO_2 , saturado en humedad. Se elimina el medio de cultivo por aspiración y se distribuyen 30 μl de soluciones de modulador alostérico positivo (PAM) Ro 01-6128 (de 100 nM a 3 mM) diluido en tampón KREBS (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4,2 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1 g/l de glucosa, 50 mM LiCl, 1% de DMSO). Se distribuyen también seis pocillos en los cuales se reemplaza el PAM por tampón, con el fin, por una parte, de determinar la señal negativa (3 pocillos) correspondiente al ruido de fondo, y por otra parte de determinar también la señal «basal» del ensayo (3 pocillos), es decir, la señal de TR-FRET en ausencia de estimulación. Se incuba durante 30 minutos a 37°C con un 5% de CO_2 . Se distribuyen entonces 15 μl de una solución 4 nM de anticuerpo anti-IP1 previamente marcado con criptato de europio (para tener 1 nM final en el ensayo) y luego 15 μl de una solución 12 nM de IP1 marcado con el fluoróforo d2 (en adelante IP1-d2), para tener 3 nM finales en el ensayo. Se diluyen estos dos reactivos en tampón HEPES 50 mM, pH 7, 0.2% de BSA, 0,8 M KF y 1% de Tritón X100. En los pocillos que sirven para determinar la señal negativa, se reemplaza el IP1-d2 por tampón. Se incuba durante 2 h a 4°C y se efectúa una medición de la fluorescencia en tiempo resuelto ($t_d = 50\mu\text{s}$, $t_g = 400\mu\text{s}$) a 620 nm y 665 nm (respectivamente, E620 y E665) en un aparato Rubystar® (BMG Labtech). A partir de los valores de intensidad de fluorescencia E620 y E665, se calcula la razón de intensidad E665/E620, denominada ratio, que se multiplica por 10.000 para mayor comodidad. Se calculan los valores de delta F con respecto a la ratio medida en un pocillo sin IP1-d2 (señal negativa, cf. G. Mathis, Clin. Chem. 39 (1993), 1953, y la solicitud W092/13264). Se calculan los porcentajes de inhibición obtenidos en función de la estimulación del receptor a partir de los delta F, equivaliendo el delta F medido en el pocillo de «señal basal» sin fármaco al 0% de inhibición.

En ausencia de PAM, se eleva la señal medida resultante de la transferencia de energía entre anticuerpo anti-IP1 marcado con criptato de europio y el IP1-d2. Cuando se activa el receptor mGlu1 por el PAM, se produce IP1 en la célula y la señal decrecerá en función de la concentración de PAM. Esta señal puede ser, o bien la razón de intensidad E665/E620, o bien el delta F.

Este resultado puede también ser expresado calculando el porcentaje de inhibición de la señal basal (medida en ausencia de PAM) inducida por la adición de una concentración creciente de PAM.

Las Figuras 15A y 15B dan la modulación de la señal en función de la concentración de PAM expresada ya sea como razón de intensidad o como delta F.

Ejemplo 27: Titulación del IP1 en células HEK-293 que expresan el receptor mGlu5 (transfección transitoria), efecto de un agonista inverso sobre el mGluR5.

En una placa de cultivo opaca de 96 pocillos, se distribuyen 100.000 células HEK-293 previamente transfectadas por electroporación para expresar el receptor mGluR5, bajo 100 μ l de medio DMEM complementado por un 10% de SVF, penicilina-estreptomomicina y aminoácidos no esenciales.

Se incuba durante 3 h a 37°C con un 5% de CO₂, saturado en humedad, antes de cambiar el medio por 100 μ l de DMEM que contiene glutamax (glutamina no degradable a glutamato) y desprovisto de suero.

Se incuba durante una noche a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂, saturado en humedad. Se elimina el medio de cultivo por aspiración y se distribuyen 30 μ l de soluciones de agonista inverso (de 5 nM a 100 μ M), la 2-metil-6-(feniletinil)piridina (MPEP), diluida en tampón KREBS (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4,2 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 g/l de glucosa, 50 mM LiCl, 1% de DMSO). Se distribuyen igualmente seis pocillos en los cuales se reemplaza la MPEP por tampón, con el fin, por una parte, de determinar la señal negativa (3 pocillos) correspondiente al ruido de fondo, y por otra parte de determinar también la señal «basal» del ensayo (3 pocillos), es decir, la señal de TR-FRET en ausencia de estimulación.

Se incuba durante 1 hora a 37°C con un 5% de CO₂. Se distribuyen a continuación 15 μ l de una solución 4 nM de anticuerpo anti-IP1 previamente marcado con criptato de europio (para tener 1 nM final en el ensayo) y luego 15 μ l de una solución 12 nM de IP1 marcado con el fluoróforo d2 (en adelante IP1-d2), para tener 3 nM finales en el ensayo. Se diluyen estos dos reactivos en tampón HEPES 50 mM, pH 7, 0,2% de BSA, 0,8 M KF y 1% de Tritón X100. En los pocillos que sirven para determinar la señal negativa, se reemplaza el IP1-d2 por tampón. Se incuba durante 1 h a 4°C y se efectúa una medición de la fluorescencia en tiempo resuelto (td = 50 μ s, tg = 400 μ s) a 620 nm y 665 nm (respectivamente, E620 y E665) en un aparato Rubystar® (BMG Labtech). A partir de los valores de intensidad de fluorescencia E620 y E665, se calcula la razón de intensidad E665/E620, denominada ratio, que se multiplica por 10.000 para mayor comodidad.

Se calculan los valores de delta F con respecto a la ratio medida en un pocillo sin IP1-d2 (señal negativa, cf. G. Mathis, Clin. Chem. 39 (1993), 1953, y la solicitud W092/13264). Se calculan los porcentajes de inhibición obtenidos en función de la estimulación del receptor a partir de los delta F, equivaliendo el delta F medido en el pocillo de «señal basal» sin fármaco al 0% de inhibición.

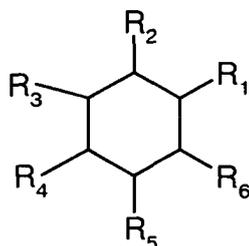
En ausencia de agonista inverso, la señal medida resultante de la transferencia de energía entre el anticuerpo anti-IP1 marcado con criptato de europio y el IP1-d2 es relativamente débil, ya que el receptor mGluR5 posee una actividad constitutiva que induce una producción moderada de IP1 intracelular que inhibe la señal de TR-FRET. Cuando la actividad constitutiva del receptor mGluR5 es bloqueada por la adición del MPEP, ello dará lugar a una disminución de la producción de IP1 intracelular. Por consiguiente, la señal del ensayo aumentará en función de la concentración de agonista inverso. Esta señal puede ser, o bien la razón de intensidad E665/E620, o bien el delta F.

También se puede expresar este resultado calculando el porcentaje de inhibición de la señal basal (medida en ausencia de MPEP) inducida por la adición de una concentración creciente de MPEP.

Las Figuras 16A y 16B dan la modulación de la señal en función de la concentración de MPEP expresada ya sea como razón de intensidad o como delta F.

REIVINDICACIONES

1. Análogo funcional del IP1 de fórmula (I):



(I)

5

en la cual:

10 los substituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son seleccionados entre: $-\text{OH}$, $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$, $-(\text{CONH})_q\text{-L-G}$ u $-(\text{CONH})_q\text{-L-M}$, a condición de que uno de los substituyentes R_1 a R_6 sea un grupo $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$ y uno de los otros substituyentes R_1 a R_6 sea uno de los grupos $-(\text{CONH})_q\text{-L-G}$ u $-(\text{CONH})_q\text{-L-M}$, siendo los otros substituyentes R_1 a R_6 grupos $-\text{OH}$;

donde:

15 q es igual a 1,

L es un grupo de unión,

G es un grupo de reacción y

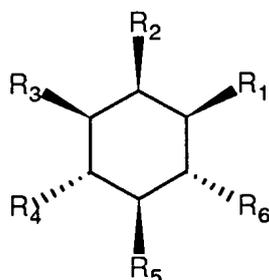
M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un inmunógeno, un soporte sólido o un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre los miembros de los pares siguientes:

20

avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo y oligonucleótido de una sola hebra/oligonucleótido de una sola hebra complementario.

2. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (II):

25



(II)

en la cual:

30 uno de los substituyentes R_1 , R_3 , R_4 o R_5 es seleccionado entre los grupos $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$ u $-\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$,

uno de los otros substituyentes R_1 - R_6 es seleccionado entre los grupos $-(\text{CONH})_q\text{-L-G}$ u $-(\text{CONH})_q\text{-L-M}$ y los otros substituyentes son grupos OH ,

donde:

35

q es igual a 1,

L es un grupo de unión,

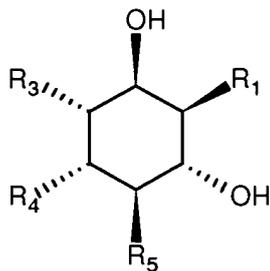
G es un grupo de reacción y

M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un inmunógeno, un soporte sólido o un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre los miembros de los pares siguientes:

40

avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo y oligonucleótido de una sola hebra/oligonucleótido de una sola hebra complementario.

3. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (III):



(III)

5 en la cual:

uno de los sustituyentes R₁, R₄ y R₅ es seleccionado entre: -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻,
 R₃ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M y
 los otros sustituyentes R₁, R₄ y R₅ son grupos -OH,
 donde:

q es igual a 1,

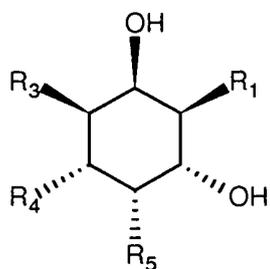
L es un grupo de unión,

G es un grupo de reacción y

M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un
 inmunógeno, un soporte sólido o un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre
 los miembros de los pares siguientes:

avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo y oligonucleótido de una sola
 hebra/oligonucleótido de una sola hebra complementario.

4. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (IV):



(IV)

25 en la cual:

uno de los sustituyentes R₁, R₃ y R₄ es seleccionado entre: -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻,
 R₅ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M y
 los otros dos sustituyentes R₁, R₃ y R₄ son grupos -OH,
 donde:

q es igual a 1,

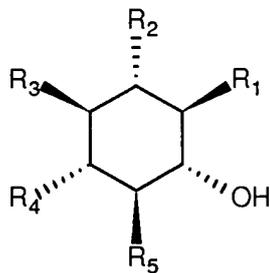
L es un grupo de unión,

G es un grupo de reacción y

M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un
 inmunógeno, un soporte sólido y un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre
 los miembros de los pares siguientes:

avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo y oligonucleótido de una sola
 hebra/oligonucleótido de una sola hebra complementario.

5. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (V):



(V)

5 en la cual:

uno de los sustituyentes R₁, R₃, R₄ y R₅ es seleccionado entre: -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻,
 R₂ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M y
 los otros sustituyentes R₁, R₃, R₄ y R₅ son grupos -OH;

10

donde:

q es igual a 1,

L es un grupo de unión,

G es un grupo de reacción y

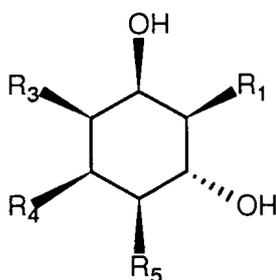
15

M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un
 inmunógeno, un soporte sólido y un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre
 los miembros de los pares siguientes:

20

avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo y oligonucleótido de una sola
 hebra/oligonucleótido de una sola hebra complementario.

6. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (VI):



(VI)

25 en la cual:

uno de los sustituyentes R₁, R₃ y R₅ es seleccionado entre: -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻,
 R₄ es seleccionado entre: -(CONH)_q-L-G u -(CONH)_q-L-M y
 los otros sustituyentes R₁, R₃ y R₅ son grupos OH,

30

donde:

q es igual a 1,

L es un grupo de unión,

G es un grupo de reacción y

35

M es una sustancia o molécula conjugada seleccionada entre el grupo siguiente: un rastreador, un
 inmunógeno, un soporte sólido y un miembro de un par de compañeros de unión seleccionado entre
 los miembros de los pares siguientes:

avidina o estreptavidina/biotina, hapteno/anticuerpo y oligonucleótido de una sola
 hebra/oligonucleótido de una sola hebra complementario.

7. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por** seleccionar el par hapteno/anticuerpo entre los pares 6HIS/anticuerpo anti-6HIS, FLAG/anticuerpo anti-FLAG, DNP/anticuerpo anti-DNP, GST/anticuerpo anti-GST, Cmyc/anticuerpo anti-Cmyc y HA/anticuerpo anti-HA.

5 8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por** seleccionar el grupo R₁ entre los grupos -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻.

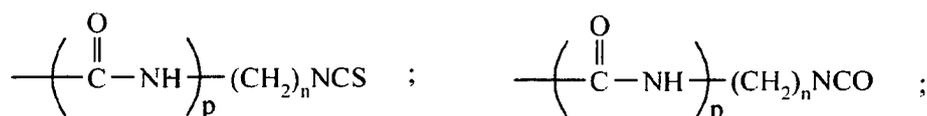
9. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por** seleccionar el grupo R₄ entre los grupos -OPO₃²⁻, -OPO(OH)₂ u -OPO(OH)O⁻.

10. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por** ser el grupo de unión L un enlace covalente sencillo o un brazo de espaciamento que tiene de 1 a 20 átomos diferentes del hidrógeno seleccionados entre los átomos de carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre, siendo este grupo de unión lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, y estando constituido por una combinación de enlaces seleccionados entre: los enlaces carbono-carbono, que pueden ser sencillos, dobles, triples o aromáticos; los enlaces carbono-nitrógeno; los enlaces nitrógeno-nitrógeno; los enlaces carbono-oxígeno; los enlaces carbono-azufre; los enlaces fósforo-oxígeno; los enlaces fósforo-nitrógeno; los enlaces éter; los enlaces éster; los enlaces tioéter; los enlaces amina; los enlaces amida; los enlaces carboxamida; los enlaces sulfonamida; los enlaces urea; los enlaces uretano; los enlaces hidrazina y los enlaces carbamoilo.

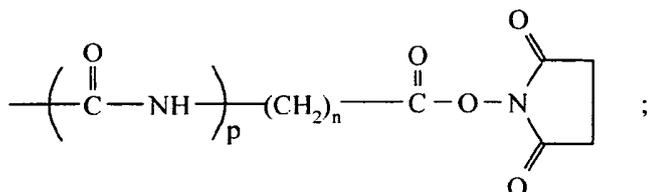
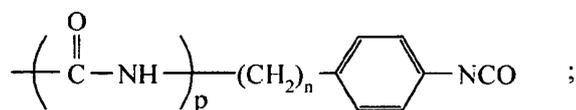
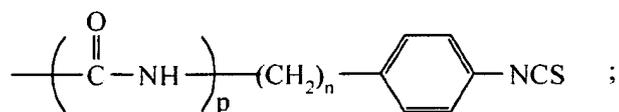
11. Compuesto según la reivindicación 10, **caracterizado por** tener el grupo de unión L de 1 a 20 átomos diferentes del hidrógeno, seleccionados entre los átomos de carbono, nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre, y **por** tener además al menos un enlace seleccionado entre los enlaces éter, tioéter, carboxamida, sulfonamida, hidrazina, amina y éster y enlaces aromáticos o heteroaromáticos.

12. Compuesto según la reivindicación 10, **caracterizado por** seleccionar el grupo de unión L entre las cadenas substituidas o no substituidas siguientes: polimetileno, arileno, alquilarileno, arilenalquilo o ariltío.

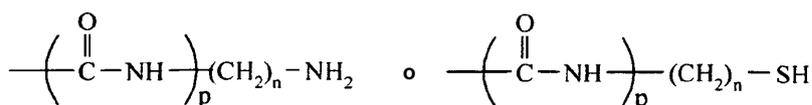
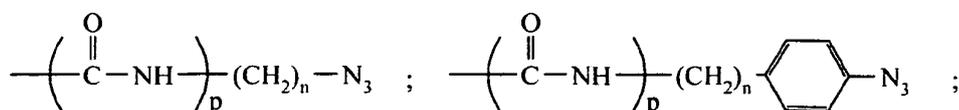
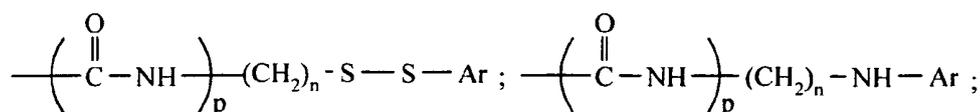
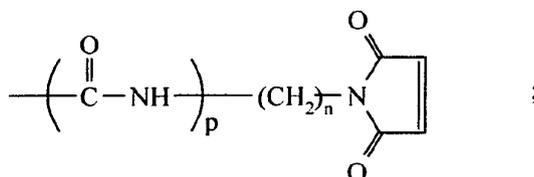
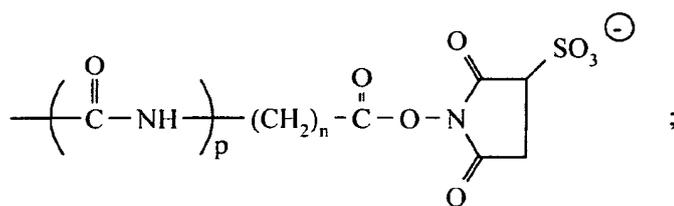
13. Compuesto según las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por** seleccionar el grupo de reacción G entre los grupos derivados de los compuestos siguientes: una acrilamida, una amina activada (por ejemplo, una cadaverina o una etilendiamina), un éster activado, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, una anilina, una azida, una aziridina, un ácido carboxílico, un diazoalcano, una haloacetamida, una halotriazina, tal como monoclorotriazina o diclorotriazina, una hidrazina (incluyendo en ella las hidrazidas), un imidoéster, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un haluro de sulfonilo o tiol, una cetona, una amina, un haluro de ácido, un éster de hidroxisuccinimidilo, un éster de hidroxisulfosuccinimidilo, un azidonitrofenilo, un azidofenilo, una 3-(2-piridilditio)propionamida y glicoxal, y en particular los grupos de fórmula:



40



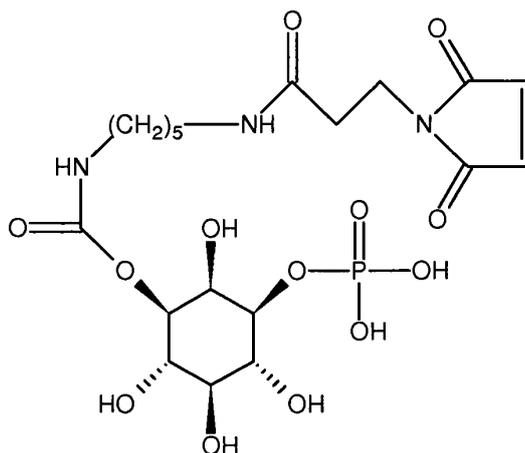
45



donde n varía de 0 a 8 y p es igual a 0 ó 1 y Ar es un heterociclo de 5 ó 6 eslabones que tiene de 1 a 3 heteroátomos, eventualmente sustituido por un átomo de halógeno.

14. Compuesto según la reivindicación 1 a 9, **caracterizado por** ser L un alquilenilo C₃-C₁₀ y **por** ser G un grupo amina.

15. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:



16. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M un rastreador.

17. Compuesto según la reivindicación 16, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M un rastreador seleccionado entre: un radioisótopo, una molécula radiomarcada, un compuesto fluorescente, un compuesto luminescente, una enzima, un cromóforo fluorescente, un cromóforo absorbente de la luz o cualquier otra molécula o sustancia que permita una medición cuantitativa directa o indirecta, a condición de que, cuando M es un

radioelemento y L es un enlace sencillo, entonces M sea diferente del tritio.

18. Compuesto según la reivindicación 17, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M un radioisótopo seleccionado entre: ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S o una molécula marcada con uno de los isótopos siguientes: ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S o ^3H , a excepción de un grupo fosfato marcado con ^{32}P .

19. Compuesto según la reivindicación 17, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M una enzima o un compuesto fluorescente seleccionado entre: las rodaminas, las cianinas, las escuarainas, los BODIPY, las fluoresceínas, los compuestos de la familia de los AlexaFluor, los quelatos de tierras raras, los criptatos de tierras raras, los puntos cuánticos, las ficobiliproteínas, tales como la B-ficoeritrina, la R-ficoeritrina, la C-ficocianina y la alofocianina, la GFP y sus derivados, una proteína fluorescente de coral, una peroxidasa y una luciferasa.

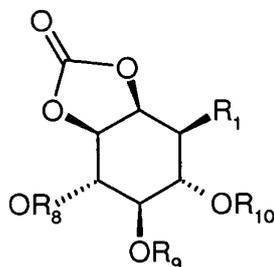
20. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M un compuesto inmunógeno.

21. Compuesto según la reivindicación 20, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M un compuesto inmunógeno seleccionado entre: la seroalbúmina bovina (BSA), la BSA catiónica (cBSA), la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine), la tiroglobulina, la ovoalbúmina, un liposoma, un polímero de L-lisina o de ácido L-glutámico, el ficoll, el dextrano o también el polietilenglicol.

22. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M un soporte sólido.

23. Compuesto según la reivindicación 22, **caracterizado por** ser la sustancia o molécula conjugada M un soporte sólido seleccionado entre: microperlas magnéticas o no, pocillos de microplaca, tubos, una fase sólida o una microesfera fluorescente.

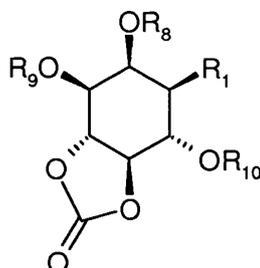
24. Compuesto de fórmula:



en la cual:

R1 es un grupo -OPO(OR7)2 y
R7, R8, R9 y R10 son idénticos o diferentes y son grupos protectores no ácido sensibles.

25. Compuesto de fórmula:



en la cual:

R1 es un grupo -OPO(OR7)2 y
R7, R8, R9 y R10 son idénticos o diferentes y son grupos protectores no ácido sensibles.

- 5 26. Compuesto según una de las reivindicaciones 24 ó 25, **caracterizado por** ser R₈, R₉ y R₁₀ grupos protectores seleccionados entre los residuos de ésteres, tales como el pivaloilo, el benzoilo, el cloroacetilo, el fenilacetilo o el benciloxicarbonilo, los residuos de silil éteres, tales como el trimetilsililoxi, el trietilsililoxi, el terc-butildimetilsililoxi o el terc-butildifenilsililoxi, el benciloxi, el p-metoxibenciloxi, el 3,4-dimetoxibenciloxi, los aliloxi y los aliloxicarboxi, y R₇ es un grupo bencilo, o bien los dos grupos R₇ forman juntos un grupo o-xilileno.
27. Anticuerpo policlonal o monoclonal anti-IP1 obtenido por inmunización de un mamífero con un compuesto según una de las reivindicaciones 20 ó 21.
- 10 28. Kit de titulación del IP1 que incluye:
- un análogo de IP1 según las reivindicaciones 1 a 9 y
un ligando específico del IP1,
estando uno al menos de estos elementos marcado directa o indirectamente con un rastreador.
- 15 29. Kit según la reivindicación 28, **caracterizado por** incluir además un agente bloqueante de ciertas enzimas del ciclo del inositol, en particular cloruro de litio.
- 20 30. Kit según la reivindicación 28, **caracterizado por** ser el ligando específico del IP1 un anticuerpo monoclonal o policlonal específico del IP1.
- 25 31. Kit de titulación del IP1 según la reivindicación 28, **caracterizado por** seleccionar el rastreador entre: un radioelemento, un compuesto fluorescente, un compuesto luminescente, una enzima, un cromóforo fluorescente, un cromóforo absorbente de la luz o cualquier otra molécula o sustancia que permita una medición cuantitativa directa o indirecta.
- 30 32. Kit según la reivindicación 28, **caracterizado por** contener un compuesto donador y un compuesto aceptor que emite una señal resultante de una transferencia de proximidad con el compuesto donador, estando el compuesto donador unido directa o indirectamente al análogo del IP1 y estando el compuesto aceptor unido directa o indirectamente al ligando específico del IP1.
- 35 33. Kit según la reivindicación 28, **caracterizado por** contener un compuesto donador y un compuesto aceptor que emite una señal resultante de una transferencia de proximidad con el compuesto donador, estando el compuesto aceptor unido directa o indirectamente al análogo del IP1 y estando el compuesto donador unido directa o indirectamente al ligando específico del IP1.
- 40 34. Kit según una de las reivindicaciones 28 ó 29, **caracterizado por** ser el compuesto donador y el compuesto aceptor compuestos fluorescentes, **por** ser la transferencia de proximidad una transferencia de energía y **por** ser la señal emitida una señal fluorescente.
- 45 35. Procedimiento de detección del IP1 contenido en una muestra, **caracterizado por** incluir las etapas siguientes:
- contacto de la muestra con un ligando específico del IP1 y
detección de los complejos formados entre dicho ligando y el IP1 presente en la muestra.
- 50 36. Procedimiento según la reivindicación 35, **caracterizado por** estar marcado el ligando específico del IP1 directa o indirectamente con un rastreador.
- 55 37. Procedimiento según la reivindicación 35, que incluye además una etapa de introducción en la muestra de una cantidad conocida de IP1 tritiado o de IP1 marcado directa o indirectamente con un rastreador.
- 60 38. Procedimiento según una de las reivindicaciones 36 ó 37 **caracterizado por** seleccionar el rastreador entre: un radioelemento, un compuesto fluorescente, un compuesto luminescente, una enzima, un cromóforo fluorescente, un cromóforo absorbente de la luz o cualquier otra molécula o sustancia que permita una medición cuantitativa directa o indirecta.
39. Procedimiento según la reivindicación 35, **caracterizado por** estar conjugado el ligando específico del IP1 directa o indirectamente con un compuesto donador, **por** poner en contacto la muestra con IP1 conjugado directa o indirectamente con un compuesto aceptor y **por** medir la señal emitida por el compuesto aceptor, resultando esta señal de una transferencia de proximidad entre el donador y el aceptor y siendo inversamente proporcional a la cantidad de IP1 presente en la muestra.
40. Procedimiento según la reivindicación 35, **caracterizado por** estar conjugado el ligando específico del IP1

directa o indirectamente con un compuesto aceptor, **por** poner en contacto la muestra con IP1 conjugado directa o indirectamente con un compuesto donador y **por** medir la señal emitida por el compuesto aceptor, resultando esta señal de una transferencia de proximidad entre el donador y el aceptor y siendo inversamente proporcional a la cantidad de IP1 presente en la muestra.

5 41. Procedimiento según una de las reivindicaciones 35 a 40, **caracterizado por** ser el compuesto donador y el compuesto aceptor compuestos fluorescentes, **por** ser la transferencia de proximidad una transferencia de energía y **por** ser la señal emitida una señal fluorescente.

10 42. Procedimiento según la reivindicación 41, **caracterizado por** ser el compuesto fluorescente donador un criptato o un quelato de tierras raras y seleccionar el compuesto fluorescente aceptor entre: las cianinas, las rodaminas, las escuarainas, los BODIPY, las fluoresceínas, los AlexaFluor, los puntos cuánticos, las ficobiliproteínas, tales como la B-ficoeritrina, la R-ficoeritrina, la C-ficocianina y la aloficocianina, la GFP y sus derivados y una proteína fluorescente de coral.

15 43. Procedimiento de detección del IP1 según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 42, **caracterizado por** ser el ligando específico del IP1 un anticuerpo monoclonal o policlonal, un fragmento de anticuerpo, una proteína, un péptido o un aptámero.

20 44. Procedimiento según la reivindicación 35, **caracterizado por** poner la muestra en contacto con un anticuerpo específico del IP1 y un análogo del IP1 fijado sobre un soporte sólido, y que incluye además las etapas siguientes:

25 lavado del soporte sólido,
adición de un anticuerpo antiespecie que reconoce el anticuerpo anti-IP1, estando marcado dicho anticuerpo antiespecie con un rastreador, y
detección del anticuerpo antiespecie,
siendo la cantidad de anticuerpo antiespecie inversamente proporcional a la cantidad de complejo anticuerpo anti-IP1/IP1 presente en la muestra.

30 45. Procedimiento según la reivindicación 35, **caracterizado por** poner en contacto la muestra con anticuerpo específico del IP1 fijado a un soporte sólido y con un análogo del IP1 marcado con un rastreador, y que incluye además las etapas siguientes:

35 - contacto de la muestra con un anticuerpo anti-IP1 fijado sobre un soporte sólido y con un análogo del IP1 marcado con un rastreador, y que incluye además las etapas siguientes:
- lavado del soporte sólido y
- detección del IP1 marcado, siendo la cantidad de IP1 marcado inversamente proporcional a la cantidad de complejo anticuerpo anti-IP1/IP1 presente en la muestra.

40 46. Procedimiento de cribado de compuestos agonistas de un receptor de membrana cuya activación conlleva la producción de IP1 en la célula, incluyendo este procedimiento las etapas siguientes:

45 (i) Adición del compuesto de ensayo a un medio de cultivo que contiene células que expresan un receptor cuya activación conlleva la producción de IP1.
(ii) Determinación de la cantidad de IP1 con ayuda de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 43.
(iii) Comparación de la cantidad de IP1 determinada en presencia y en ausencia de este compuesto, permitiendo un aumento de la cantidad de IP1 identificar el compuesto de ensayo como agonista de dicho receptor.

50 47. Procedimiento según la reivindicación 46, **caracterizado por** incluir la etapa (ii) la adición al medio de un anticuerpo anti-IP1 marcado con un compuesto fluorescente donador o aceptor, así como la adición de IP1 marcado con un compuesto fluorescente aceptor o, respectivamente, donador, y **por** consistir la determinación de la cantidad de IP1 en medir la señal luminosa resultante de la transferencia de energía entre los dos compuestos fluorescentes, y **por** incluir la etapa (iii) la comparación de la señal medida en presencia y en ausencia de compuesto de ensayo, permitiendo una disminución de la señal medida en presencia de compuesto de ensayo identificar este compuesto como un agonista de dicho receptor.

60 48. Procedimiento de cribado de compuestos antagonistas de un receptor de membrana cuya activación conlleva la producción de IP1 en la célula, incluyendo este procedimiento las etapas siguientes:

(i) Adición del compuesto de ensayo a un medio de cultivo que contiene células que expresan un receptor cuya activación conlleva la producción de IP1.

(ii) Adición de un agonista conocido de dicho receptor.

(iii) Determinación de la cantidad de IP1 con ayuda de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 44.

5 (iv) Comparación de la cantidad de IP1 determinada en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, permitiendo una disminución de la cantidad de IP1 identificar el compuesto de ensayo como antagonista de dicho receptor.

10 49. Procedimiento según la reivindicación 48, **caracterizado por** incluir la etapa (iii) la adición al medio de un anticuerpo anti-IP1 marcado con un compuesto fluorescente donador o aceptor, así como la adición de IP1 marcado con un compuesto fluorescente aceptor o, respectivamente, donador, y **por** consistir la determinación de la cantidad de IP1 en medir la señal luminosa resultante de la transferencia de energía entre los dos compuestos fluorescentes, y **por** incluir la etapa (iv) la comparación de la señal medida en presencia y en ausencia de compuesto de ensayo, permitiendo un aumento de la señal medida en presencia de compuesto de ensayo identificar este compuesto como un antagonista de dicho receptor.

15 50. Procedimiento de cribado de compuestos agonistas inversos de un receptor de membrana constitutivamente activo, incluyendo este procedimiento las etapas siguientes:

20 (i) Adición del compuesto de ensayo a un medio de cultivo que contiene células que expresan un receptor constitutivamente activo y cuya actividad conlleva la producción de IP1.

(ii) Determinación de la cantidad de IP1 con ayuda de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 44.

25 (iii) Comparación de la cantidad de IP1 determinada en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, permitiendo una disminución de la cantidad de IP1 identificar el compuesto de ensayo como agonista inverso de dicho receptor.

30 51. Procedimiento según la reivindicación 50, **caracterizado por** incluir la etapa (ii) la adición al medio de un anticuerpo anti-IP1 marcado con un compuesto fluorescente donador o aceptor, así como la adición de IP1 marcado con un compuesto fluorescente aceptor o, respectivamente, donador, y **por** consistir la determinación de la cantidad de IP1 en medir la señal luminosa resultante de la transferencia de energía entre los dos compuestos fluorescentes, y **por** incluir la etapa (iii) la comparación de la señal medida en presencia y en ausencia de compuesto de ensayo, permitiendo un aumento de la señal medida en presencia de compuesto de ensayo identificar este compuesto como un agonista inverso de dicho receptor.

FIGURA 1

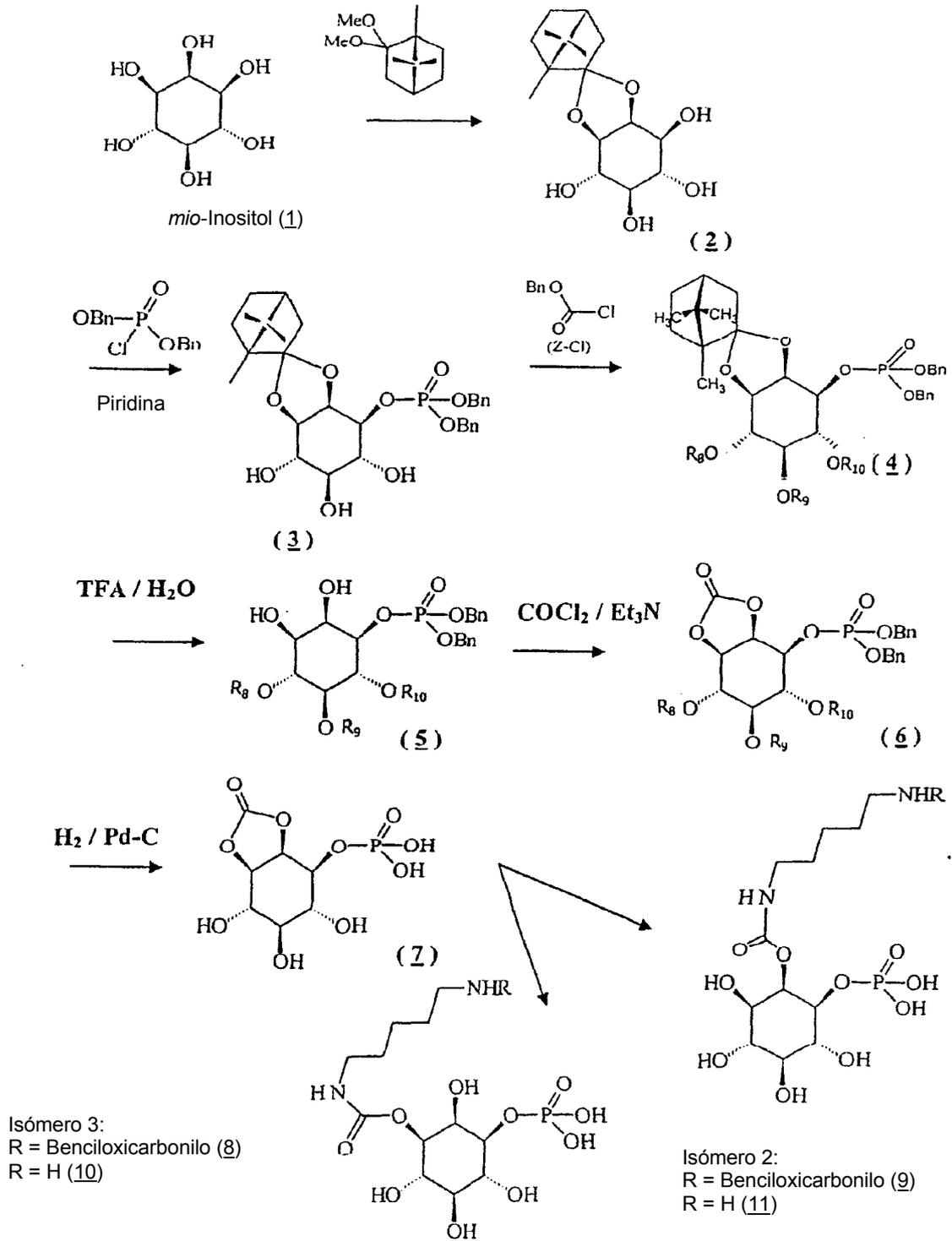


FIGURA 1 (CONTINUACIÓN)

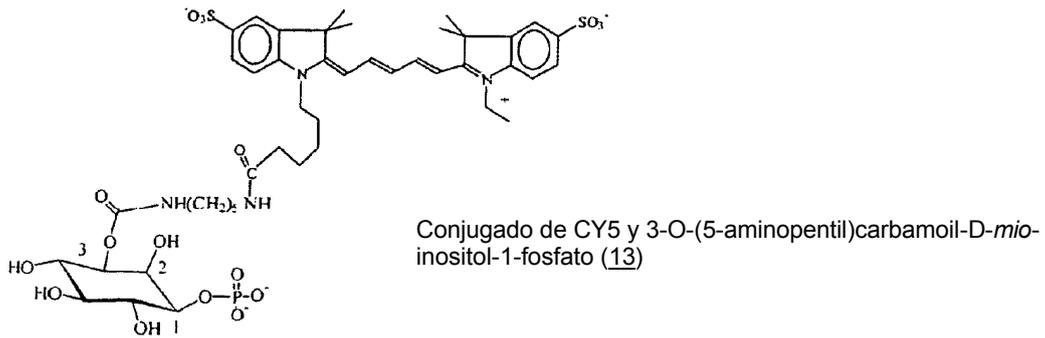
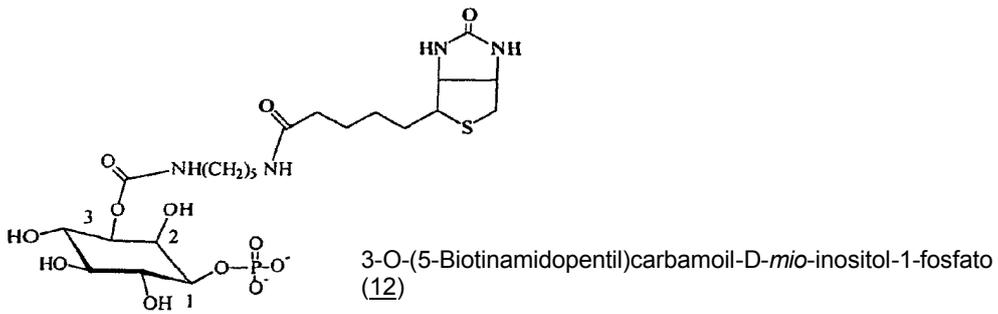
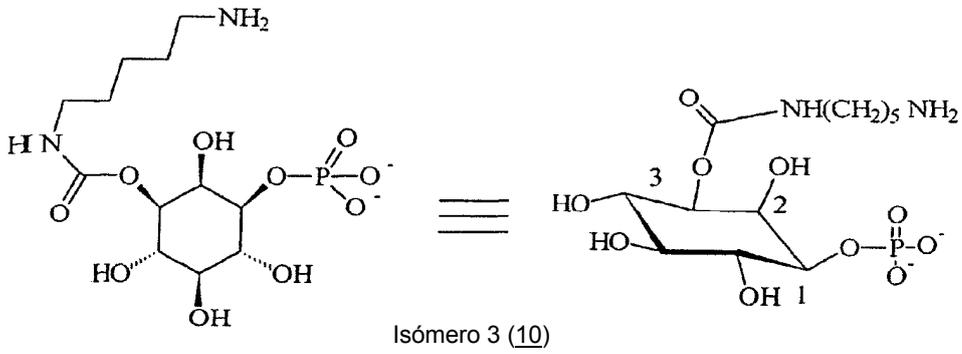


FIGURA 2

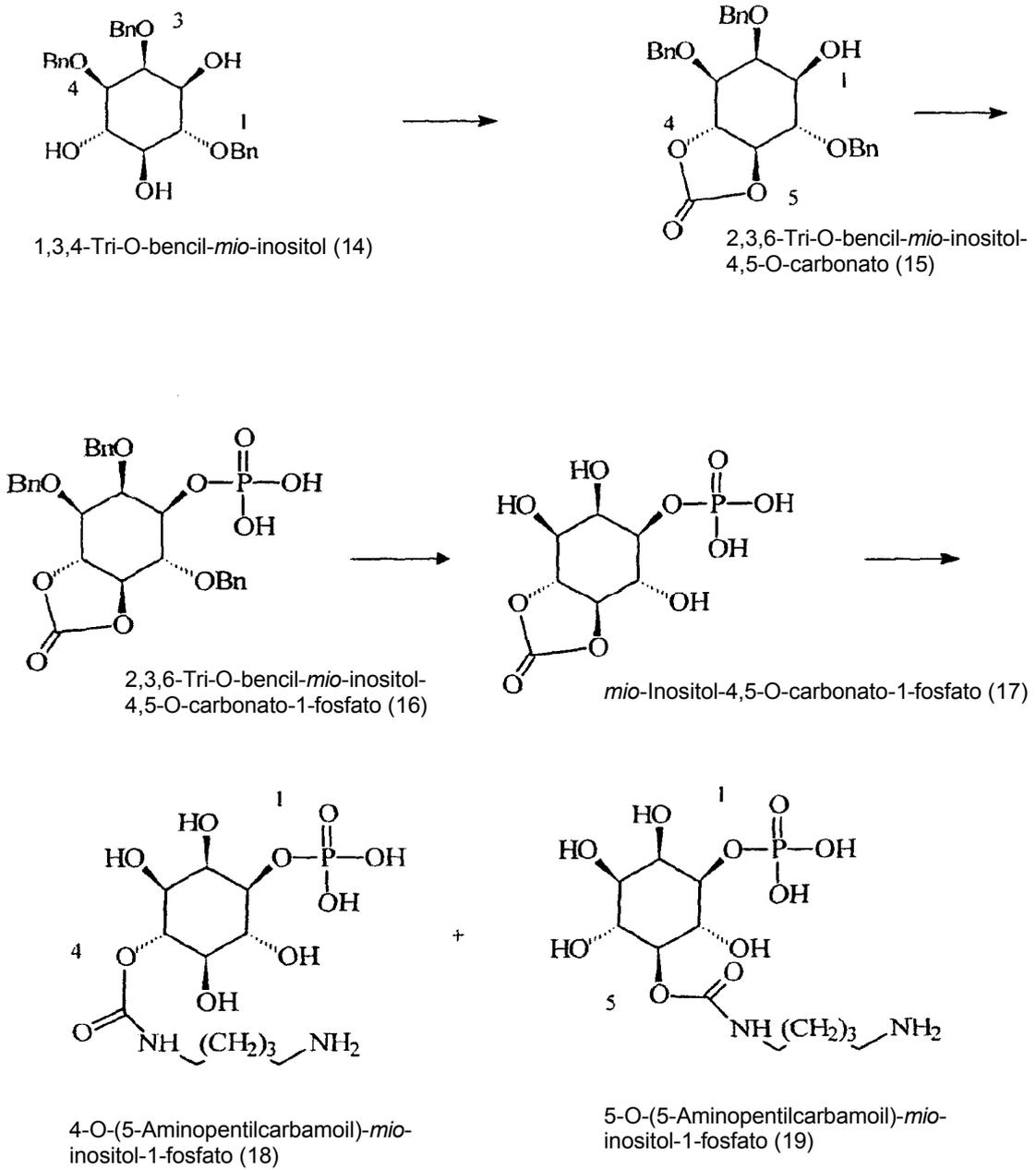


FIGURA 3

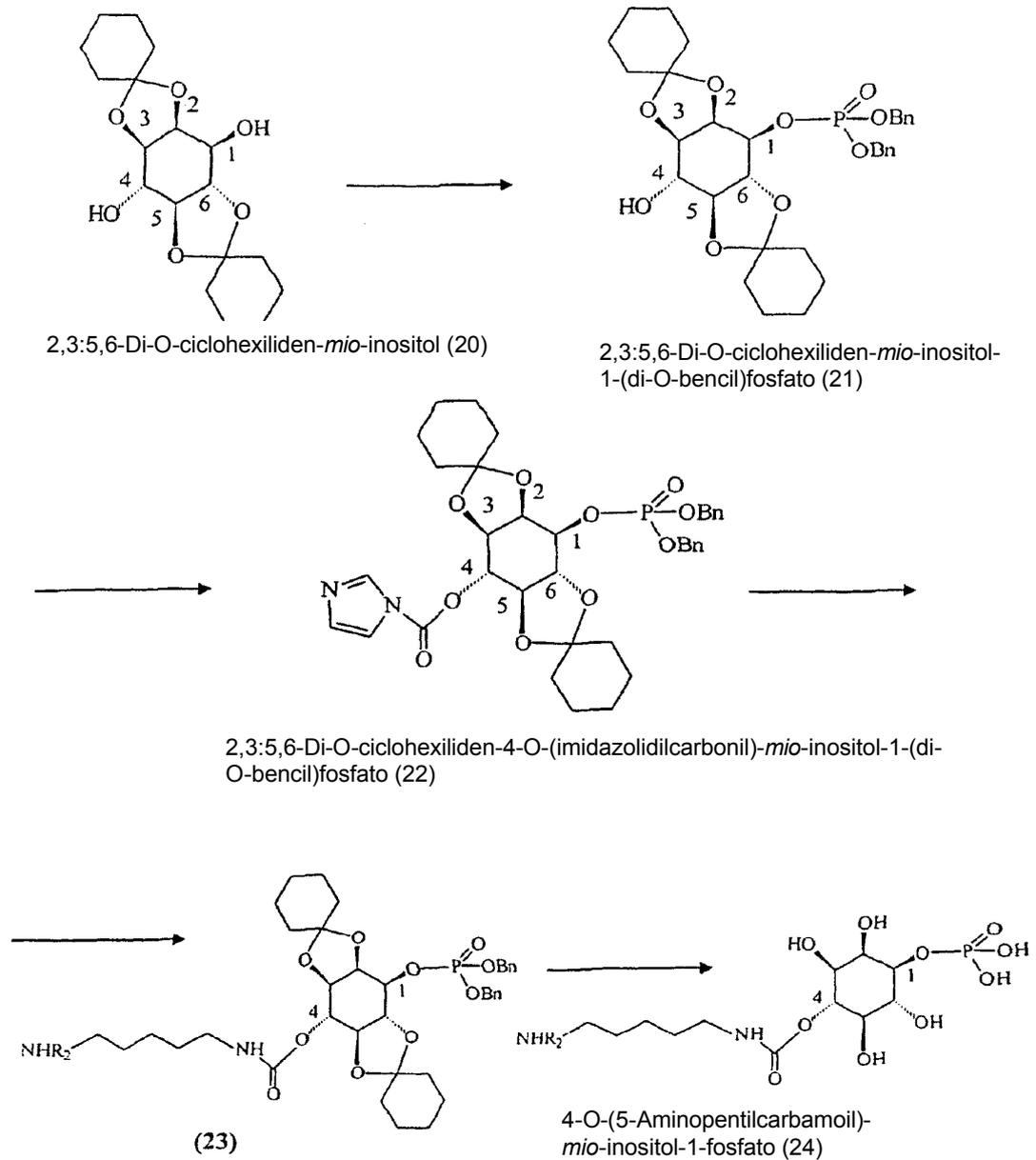


FIGURA 4

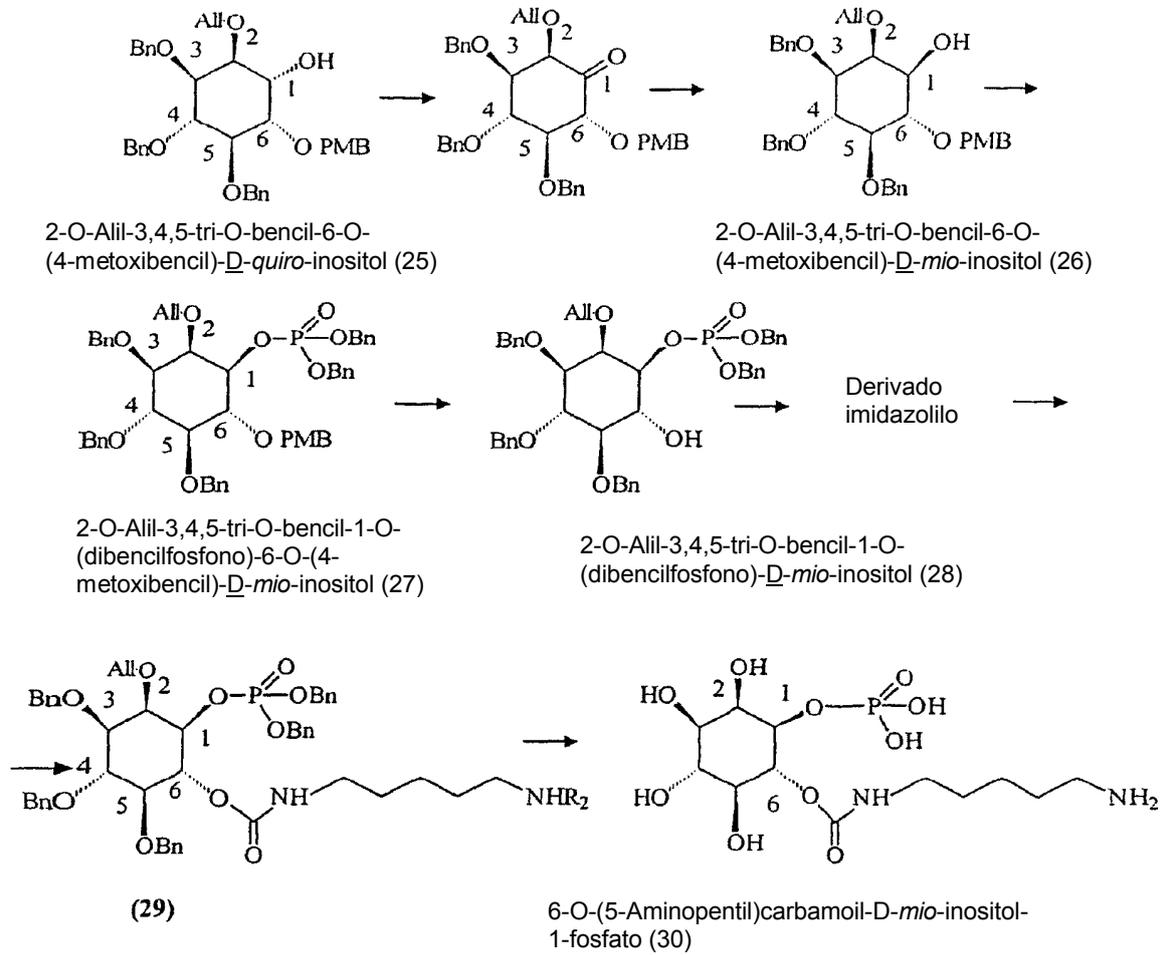
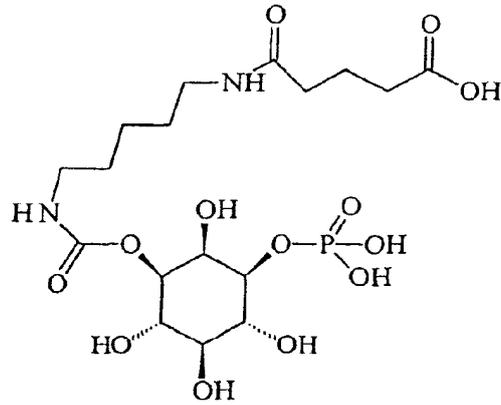
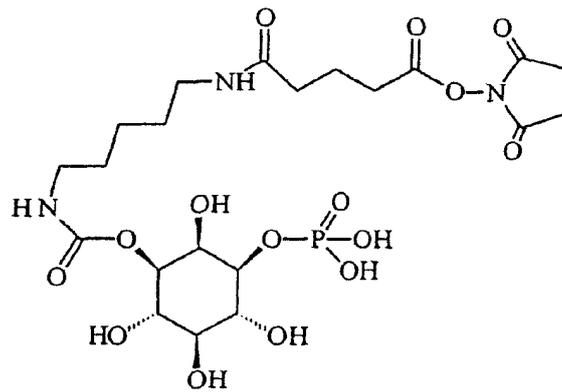


FIGURA 5

3-O-(4-Carboxibutiramido-5-pentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (31)



Éster de N-hidroxisuccinimida del 3-O-(4-carboxibutiramido-5-pentil)carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (32)



3-O-[5-(3-Maleimidopropionamido)pentil]carbamoil-D-*mio*-inositol-1-fosfato (33)

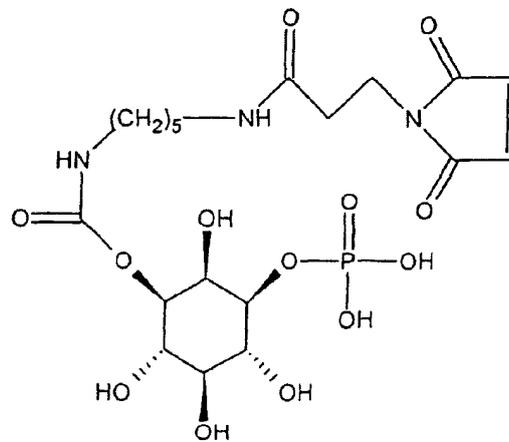


FIGURA 6

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-1-fosfato que llevan un grupo de reacción en posición 4 ó 5

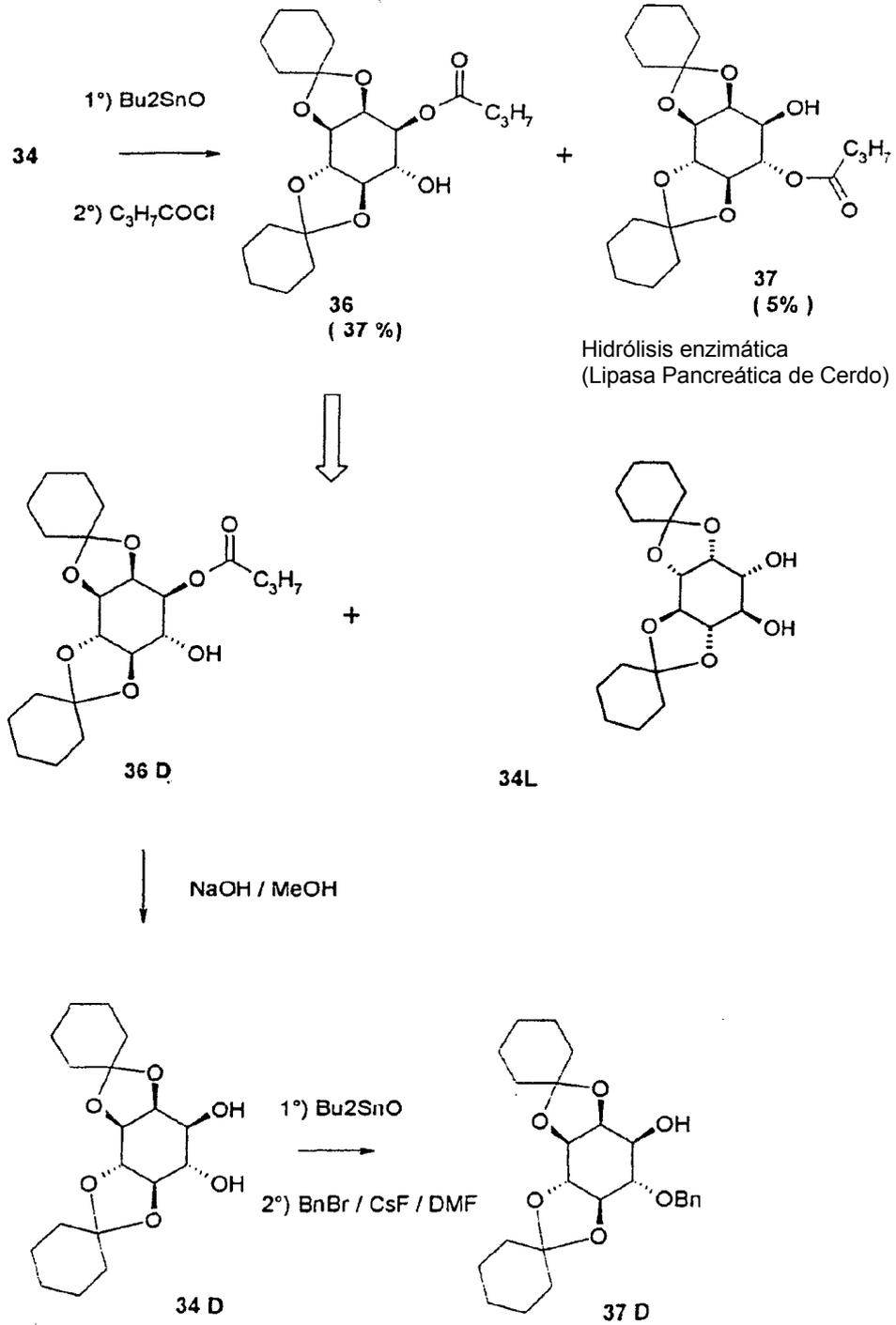


FIGURA 6 (CONTINUACIÓN)

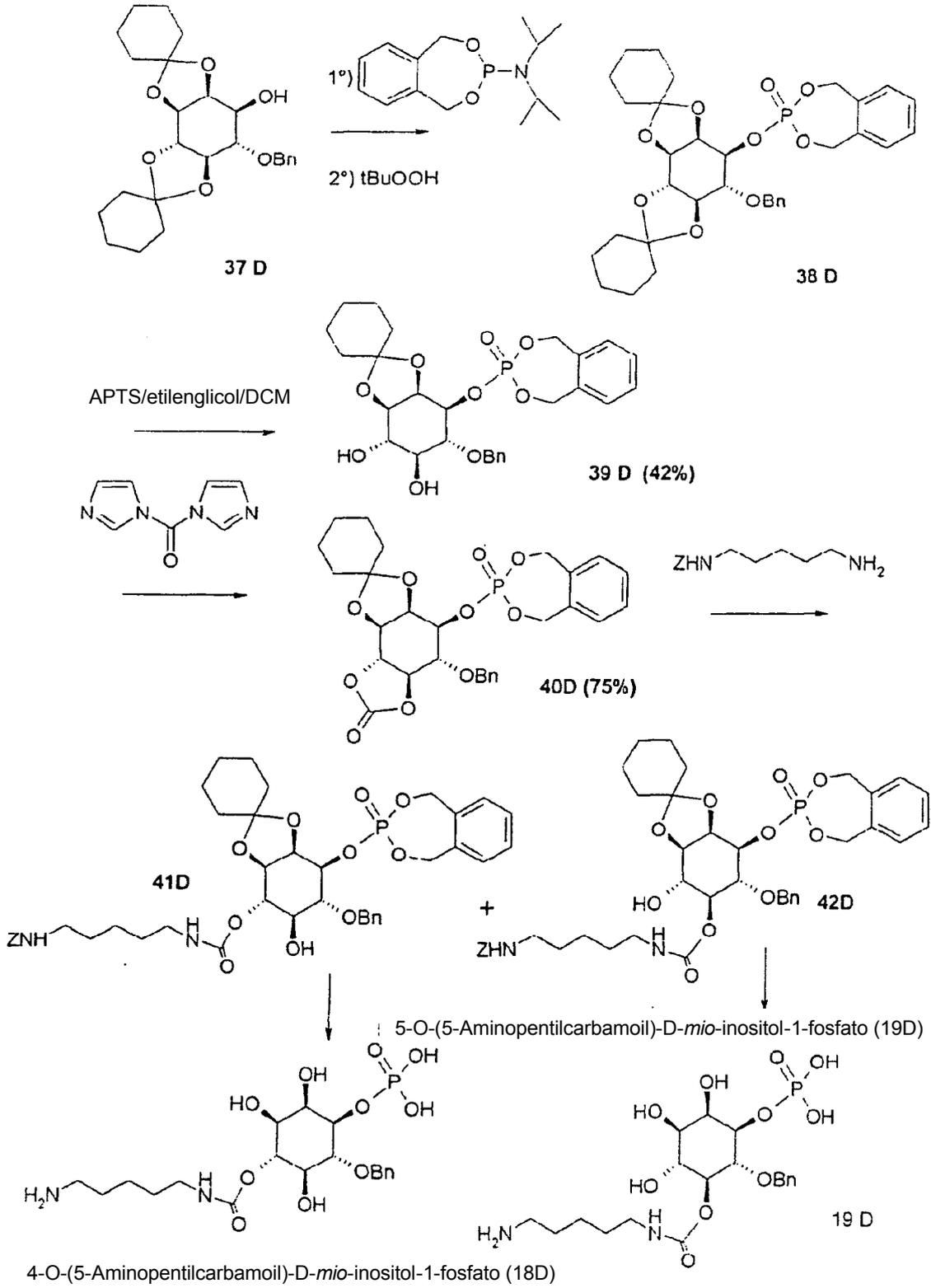
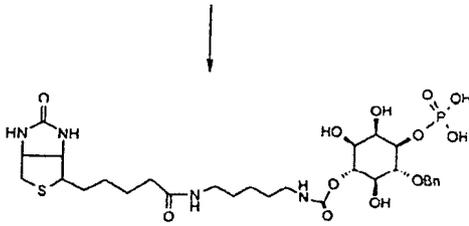


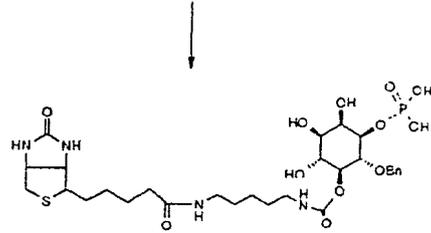
FIGURA 6 (CONTINUACIÓN)

18D



4-O-(5-Biotinamidopentil)carbamoil-D-*myo*-inositol-1-fosfato (43D)

19D



5-O-(5-Biotinamidopentil)carbamoil-D-*myo*-inositol-1-fosfato (44D)

FIGURA 7

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-4-fosfato que llevan un grupo de reacción G en posición 6

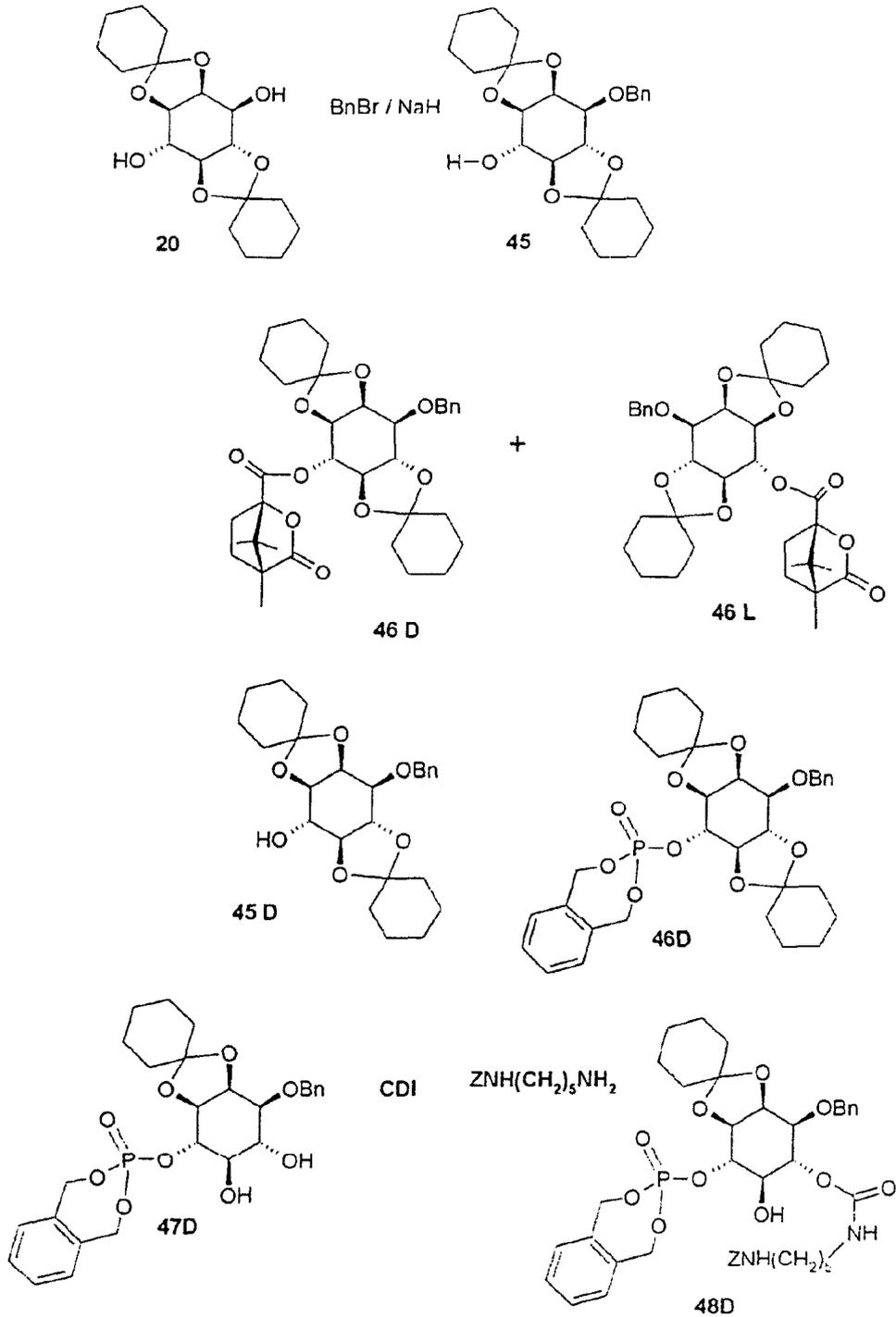


FIGURA 7 (CONTINUACIÓN)

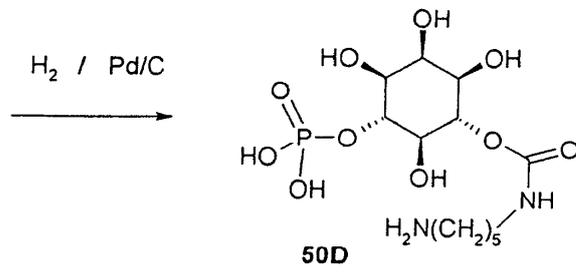


FIGURA 8

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-4-fosfato que llevan un grupo de reacción G en posición 1.

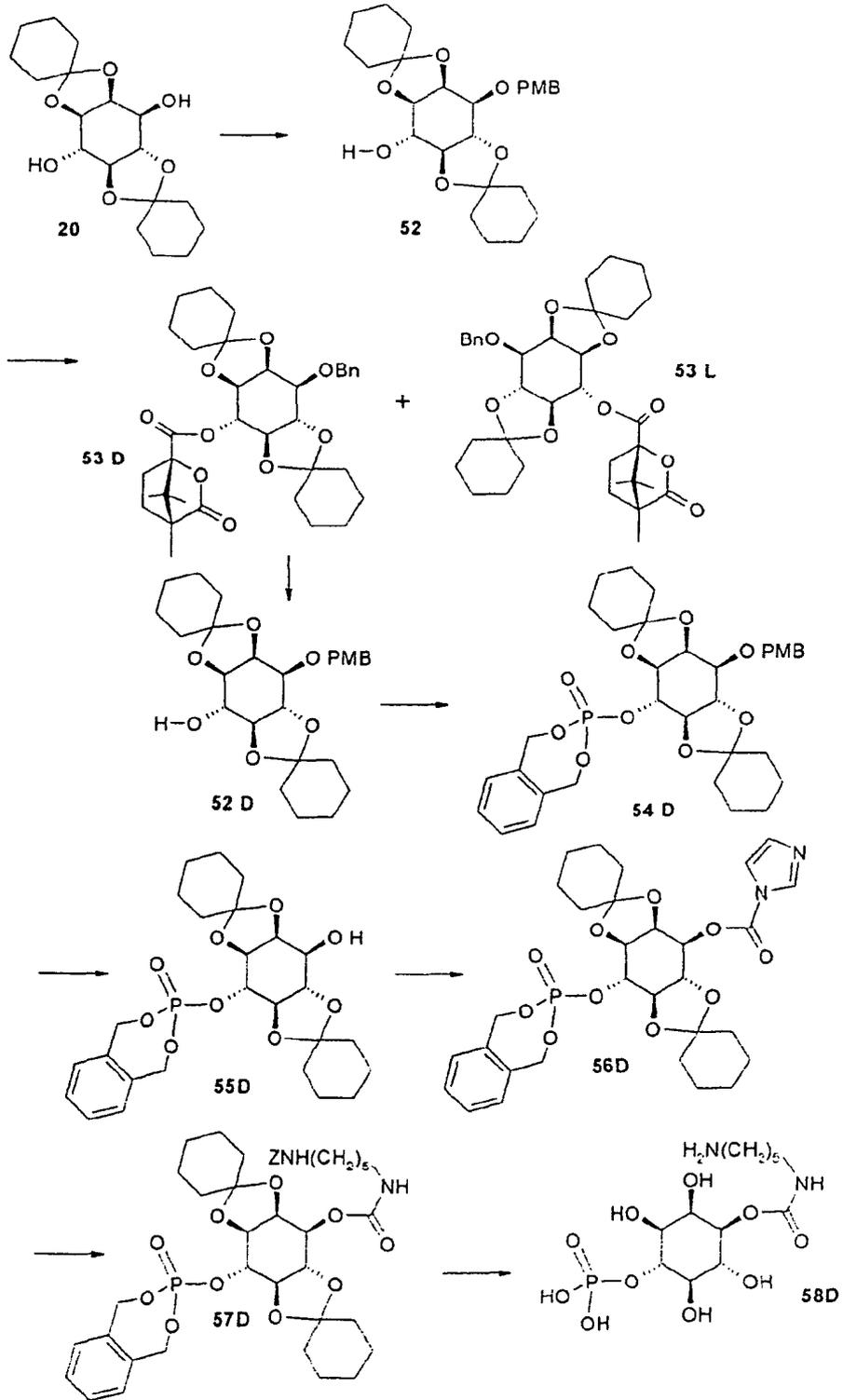


FIGURA 9

Procedimiento de síntesis de análogos del *mio*-inositol-4-P que llevan un grupo de reacción en posición 2 ó 3

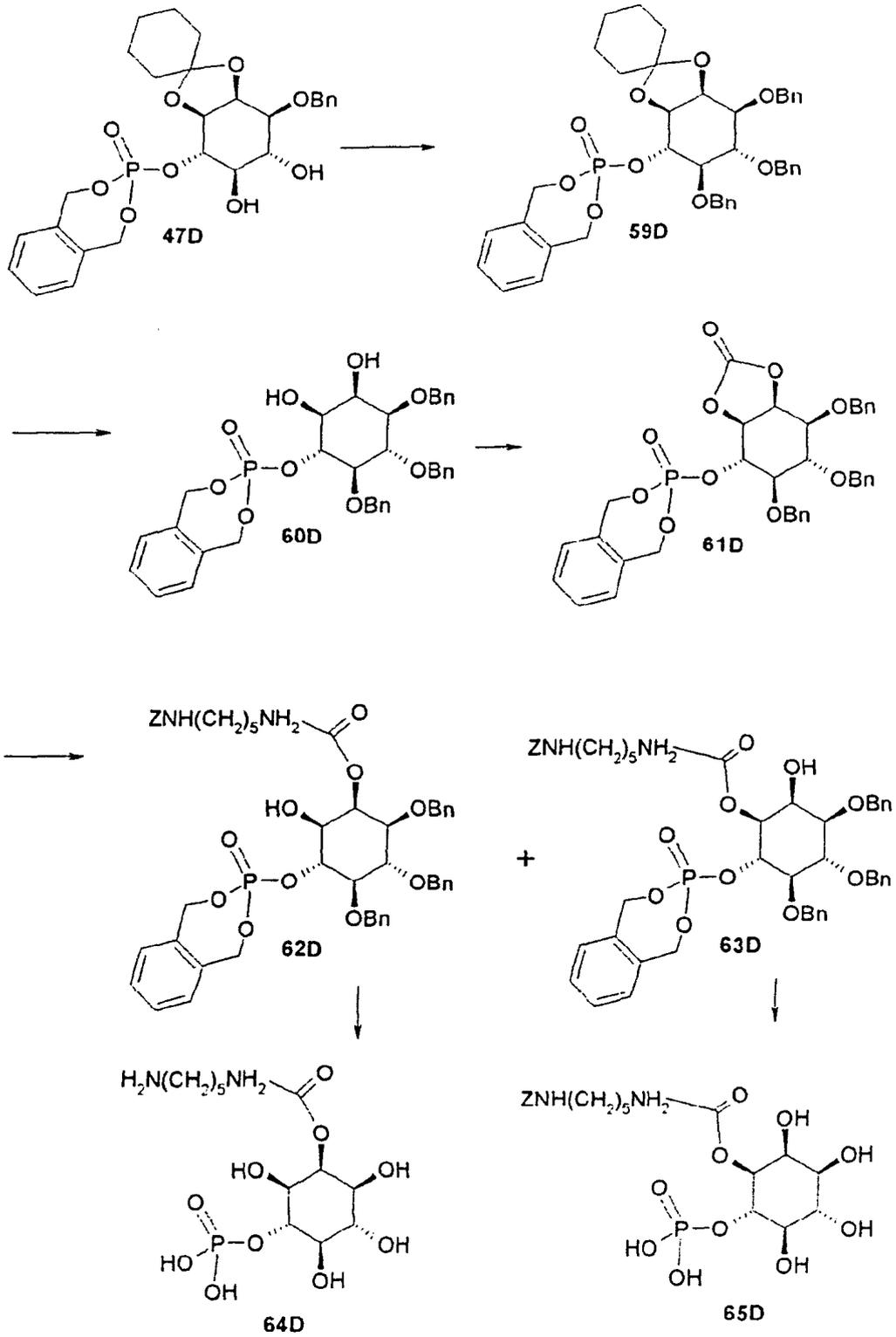


FIGURA 10

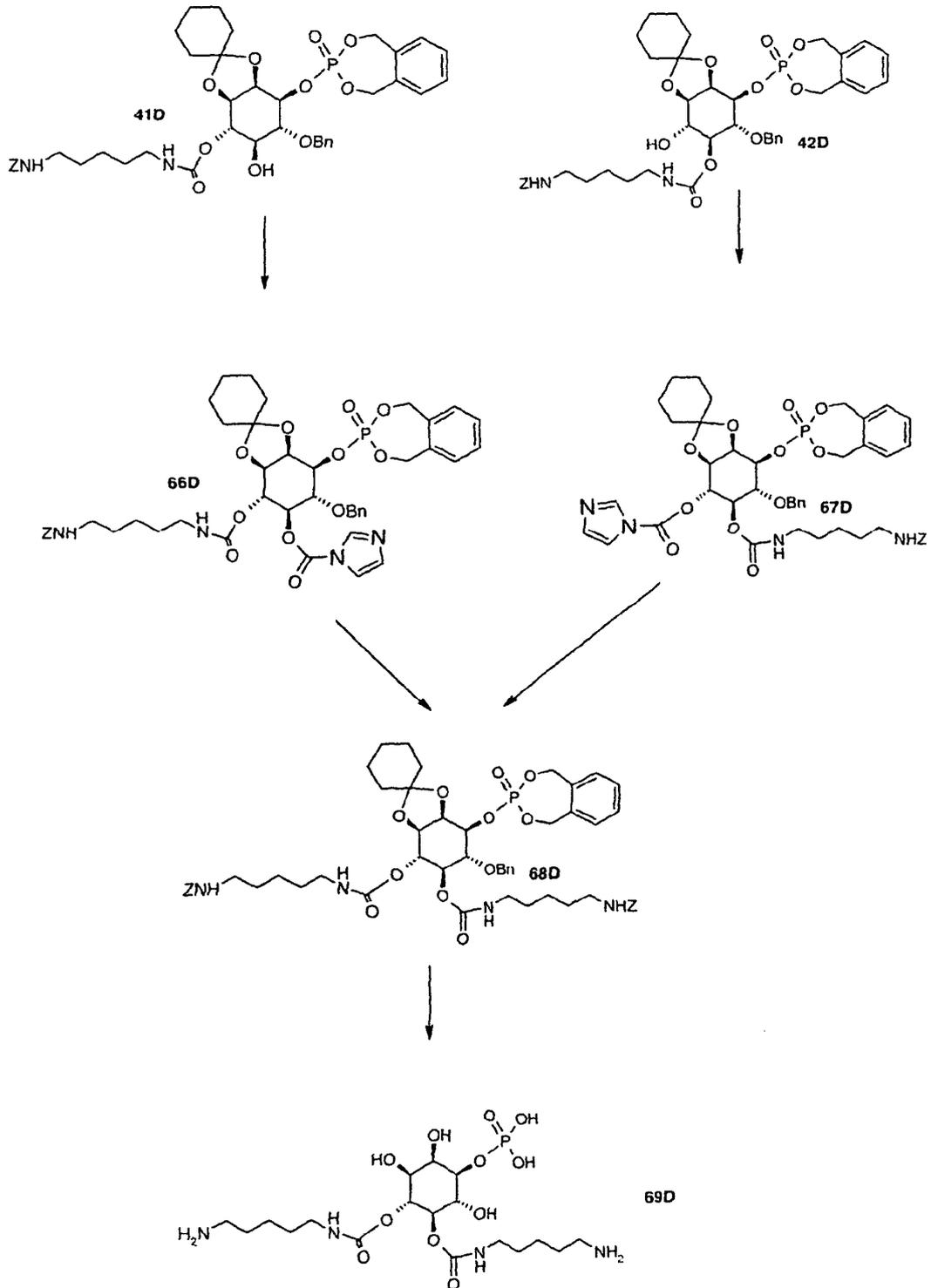


FIGURA 11

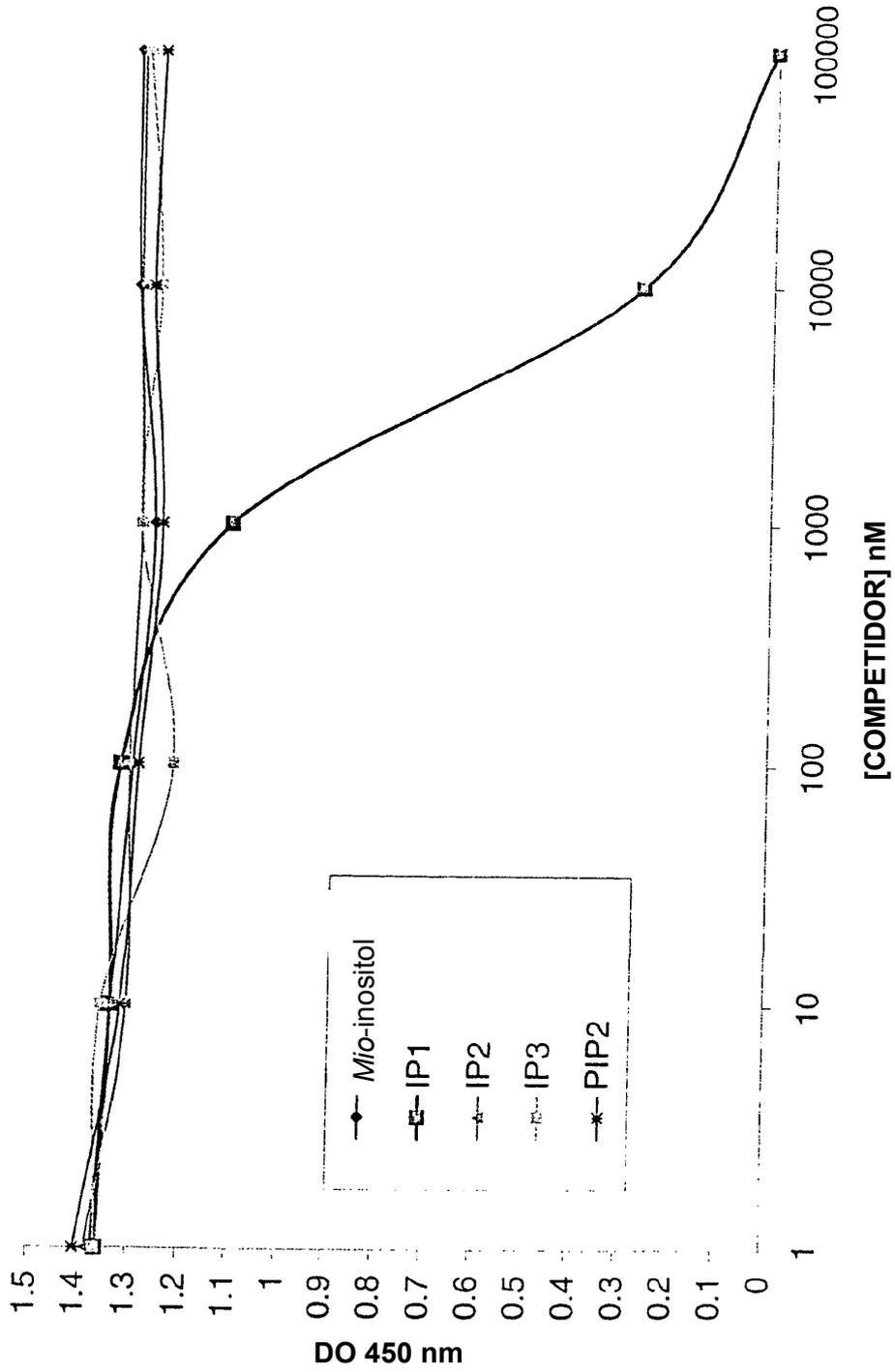


FIGURA 12

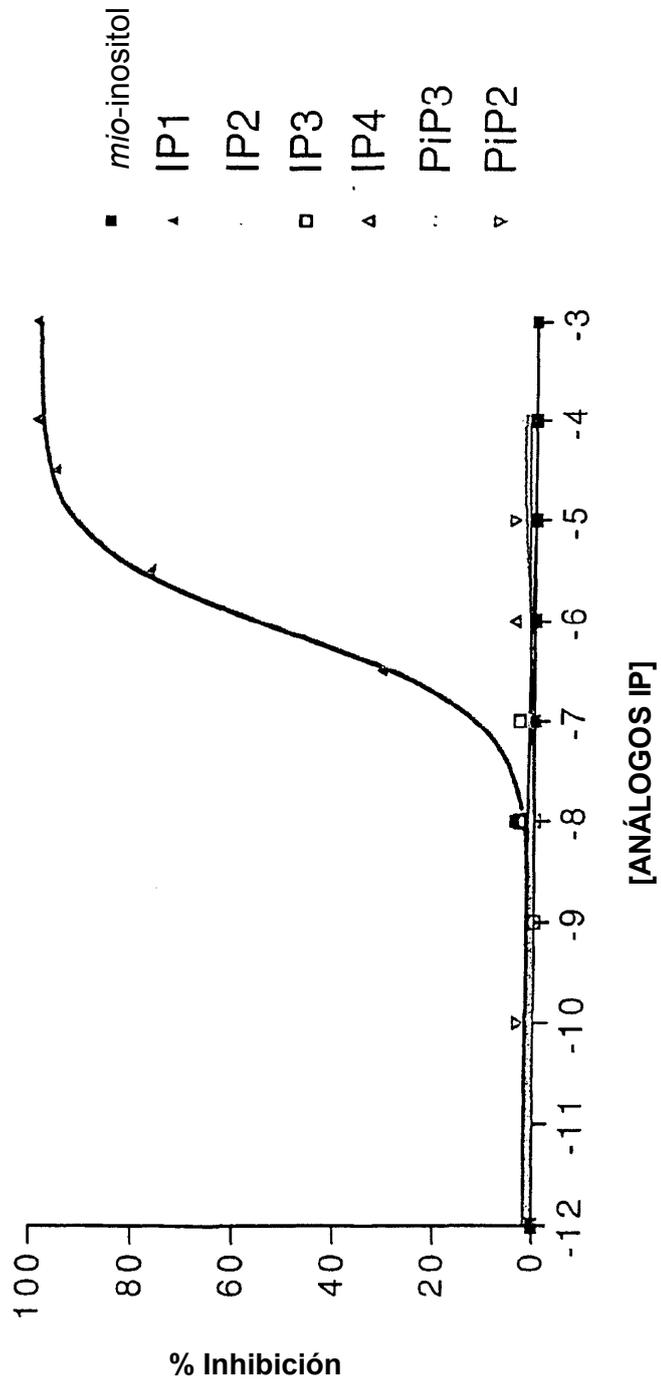


FIGURA 13A

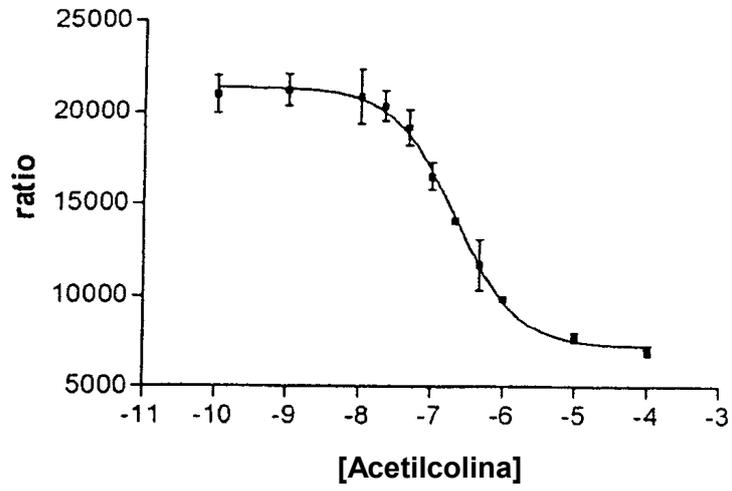


FIGURA 13B

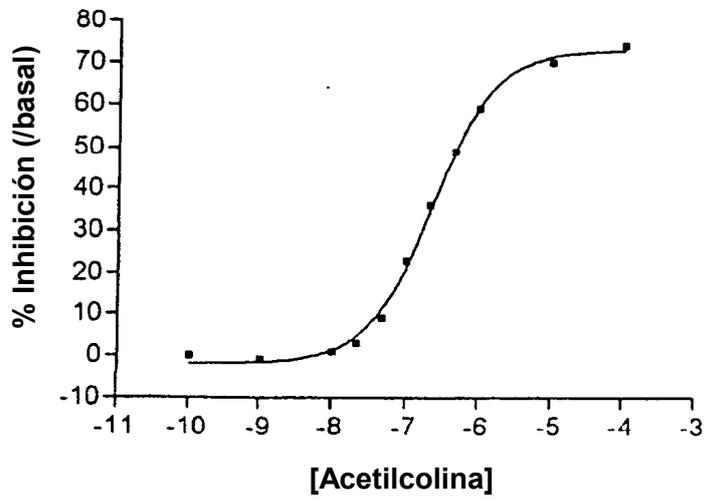


FIGURA 14A

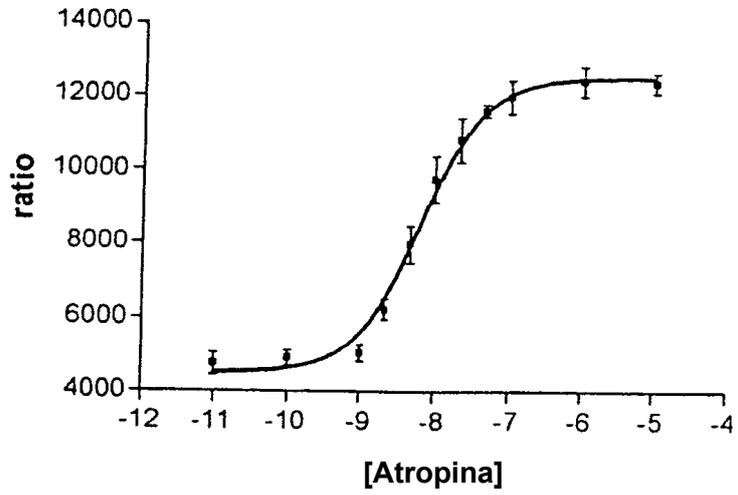


FIGURA 14B

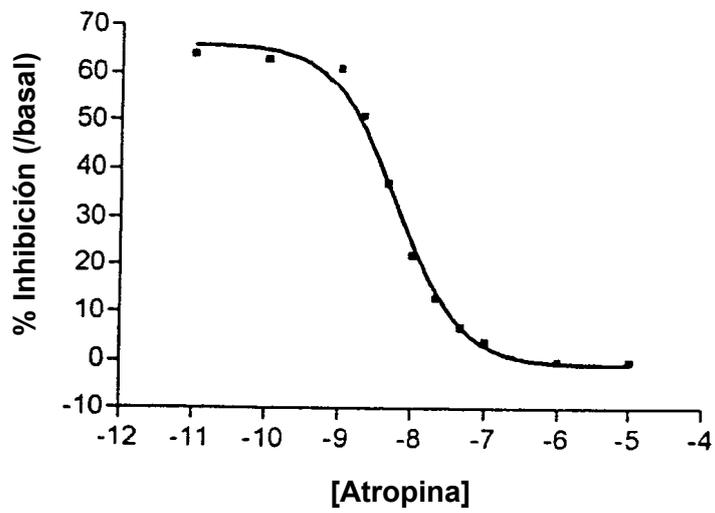


FIGURA 15A

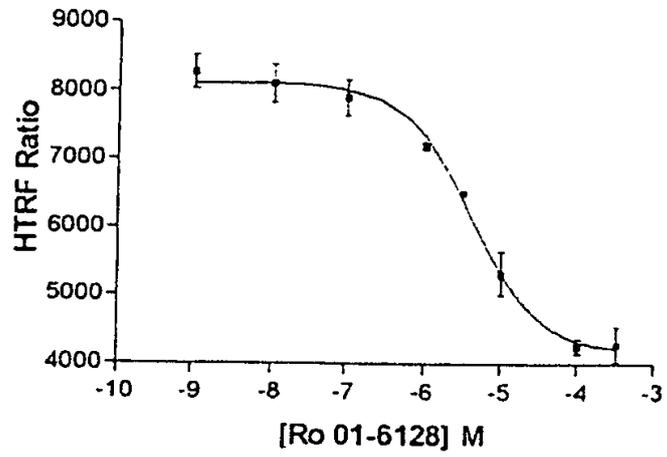


FIGURA 15B

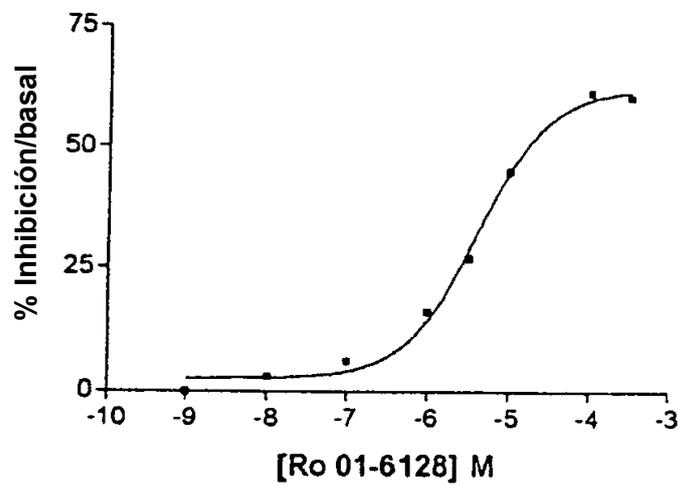


FIGURA 16A

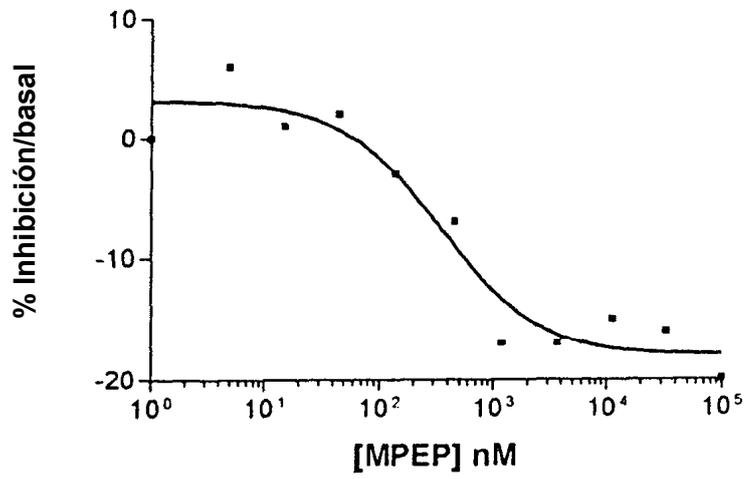


FIGURA 16B

