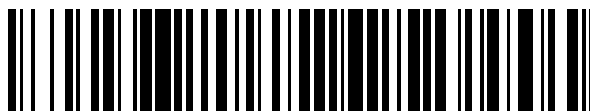


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 484**

51 Int. Cl.:

C07D 207/46 (2006.01)

C07D 207/40 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2009 PCT/US2009/033112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO2009100155**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2009 E 09708627 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2252584**

54 Título: **Compuestos y métodos para un marcaje rápido de N-glicanos**

30 Prioridad:

04.02.2008 US 26080 P

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

11.04.2017

73 Titular/es:

**PROZYME, INC. (100.0%)
3832 Bay Center Place
Hayward, CA 94545, US**

72 Inventor/es:

BAGINSKI, TOMASZ

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 608 484 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

Compuestos y métodos para un marcaje rápido de N-glicanos

5 Antecedentes de la invención

Existe un interés considerable por fabricantes de productos farmacéuticos, bioquímicos, químicos clínicos para la determinación de los perfiles de distribución de N-glicanos en muestras biológicas, tales como por ejemplo, glicoproteínas terapéuticas. El perfil de glicosilación de las proteínas terapéuticas debe monitorearse durante el desarrollo para asegurar propiedades biológicas adecuadas y durante una producción, para asegurar la consistencia del producto terapéutico. Los N-glicanos que se liberan de glicoproteínas por escisión enzimática con PNGasa F (Péptido-N4-(acetil-β-glucosaminil)-asparagina amidasa, EC 3.5.1.52) suelen marcarse en su extremo reductor libre con colorantes fluorescentes para el análisis por métodos tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar (CE), electroforesis en gel de hidratos de carbono, espectrometría de masas y otros. El marcaje fluorescente de glicanos facilita su detección sensible, así como contribuye a mejorar la resolución. Los N-glicanos liberados por PNGasa F se marcan más comúnmente por aminación reductora, donde el extremo reductor libre de un glicano se conjuga con el grupo amino libre de un colorante fluorescente. El marcaje fluorescente de glicanos por aminación reductora generalmente requiere condiciones anhidras, temperaturas elevadas y tiempos de incubación prolongados, lo que puede resultar en una degradación parcial de los componentes biológicamente importantes, elementos de marcaje de N-glicanos, por ejemplo, ácidos siálicos.

Inicialmente, los N-glicanos son liberados por PNGasa F de glicoproteínas como β-glicosilaminas, donde el extremo reductor libre del glicano liberado se conjuga con amoniaco (ver, Tarentino, y otros. *TIGG* **1993**, 23, 163-170; Rasmussen J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1124-1126; Risley, y otros. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 15488-15494, 1985). La estabilidad de las glicosilaminas depende del pH y a pH más bajo se favorece la hidrólisis rápida de glicosilaminas a glicanos con extremos reductores libre y amoniaco. A pH elevado, las glicosilaminas son estables y se hidrolizan lentamente, lo que permite el marcaje de los glicanos liberados como glicosilaminas con agentes reactivos hacia los grupos amino en lugar de los extremos reductores libres. La derivación de glicosilaminas con un número de reactivos de amina reactiva se informa (para derivación con isotiocianato de fenilo, ver, Rasmussen, J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1124-1126; para la derivación con FMOC-Cl, ver Kamoda, y otros. *J. Proteome Res.* **2005**, 4(1):146-52; para la derivación con FMOC-Cl y otros colorantes ver Kurihara T. y otros. *Anal. Chem.* 2007, 79(22):8694-8). La conversión de O-succinimidil carbamatos a N-(O-carbamilo)-succinimono amidas y ureas: los efectos de N-sustituyentes y las condiciones de reacción en el camino de la reacción se abordan en Vasilevich, y otros. *Tetrahedron Letters*, 2002, 43, 6649-6652. La preparación de derivados de O-succinimidilo-2-(tert-butoxicarbonilamino)etilcarbamato a partir de aminoácidos se aborda en Guichard, y otros. *J. Org. Chem.* **1999**, 64(23), 8702-8705.

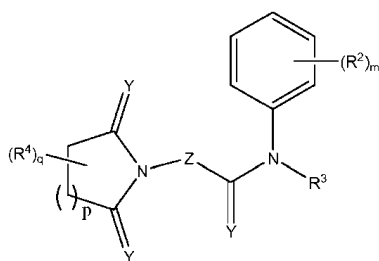
Los reactivos de carbamatos no fluorescentes y fluorescentes activados son útiles para la derivación de grupos amino y para la detección espectrofotométrica y fluorométrica de aminoácidos (ver, Nimura, y otros. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 2372-2375; Iwaki, y otros. *J. Chromatography* **1987**, 407, 273-279, 1987; Cohen, y otros. *Analytical Biochemistry* **1993**, 211, 279-287; y Patente de Estados Unidos núm. 5,296,599). Los Carbamatos dicarboximido-N-fenilsustituídos y derivados tienen actividad pesticida y son útiles como herbicidas (ver Patente de Estados Unidos núm. 4,003,912). Además, un método de análisis de compuestos aminofuncionales y reactivos analíticos se describe en la Patente EP 1 475 632.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de colorantes y métodos que sean capaces de un marcaje rápido de los glicanos en condiciones suaves, sin que causen degradación de los compuestos lábiles biológicamente activos, y puedan proporcionar alta sensibilidad de detección y alta resolución durante la separación de glicanos. Sorprendentemente, la presente invención satisface estas y otras necesidades.

50 Breve resumen de la invención

La presente invención se relaciona a compuestos y métodos para un marcaje rápido de N-glicanos. Particularmente, los compuestos son compuestos aromáticos monocíclicos fluorescentes. Ventajosamente, la muestra de N-glicanos es fácil de preparar y los métodos permiten el fácil y marcaje rápido de N-glicanos sin ninguna degradación de las muestras.

55 En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula Iα o de la Fórmula Iβ siguiente:



en donde:

cada Y es independientemente O= o S=;

Z es -O- o -S-;

cada R² se selecciona independientemente de -CO₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -NO, -N=C=NR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)₂NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b, -C(O)R^a, -C(O)SR^a, -C(S)OR^a, -C(=S)R^a, -S-CN, sulfo, fosfona, fosfonoalquilo y sulfoalquilo, en donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heteroalquilo y haloalquilo u opcionalmente R^a y R^b cuando está unido al mismo átomo de nitrógeno se combinan para formar un anillo de 5 o 6 miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo que se selecciona de O, N y S;

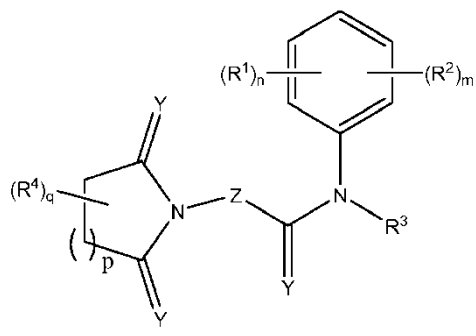
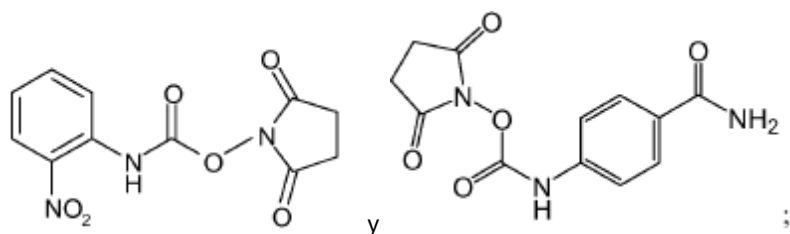
R³ es -H o C₁₋₈alquilo;

cada R⁴ es independientemente C₁₋₈alquilo;

el subíndice m es un número entero de 1 a 5;

el subíndice p es 1 o 2; y

el subíndice q es un número entero de 0 a 4, proporciona que el compuesto no se selecciona de:



Iβ

en donde:

cada Y es independientemente O= o S=;

Z es -O- o -S-;

grupos adyacentes R¹ junto con el anillo de benceno al que están unidos forman un sistema de anillo aromático carbocíclico condensado que se selecciona del grupo que consiste en naftaleno, fenantreno, antraceno, trifenileno, y pireno, cada cual tiene de 1 a 4 R⁵ sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en -COOH, -COO-M⁺, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonoalquilo;

cada R² se selecciona independientemente de -CO₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -NO, -N=C=NR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)₂NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b, -C(O)R^a, -C(O)SR^a, -C(S)OR^a, -C(=S)R^a, -S-CN, sulfo, fosfona, fosfonoalquilo y sulfoalquilo, en donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heteroalquilo y haloalquilo u opcionalmente R^a y R^b cuando está unido al mismo átomo de nitrógeno se combinan para formar un anillo de 5 o 6 miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo que se selecciona de O, N y S;

en donde M⁺ se selecciona del grupo que consiste en NH₄⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ y

R³ es -H o C₁₋₈alquilo;

cada R⁴ es independientemente C₁₋₈alquilo;

el subíndice n es un número entero de 0 a 4 que proporciona el compuesto de la Fórmula Iβ tiene grupos adyacentes R¹ que forman un sistema de anillo carbocíclico condensado como se especifica anteriormente en esta definición de la Fórmula Iβ;

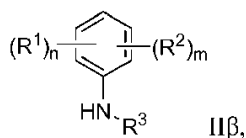
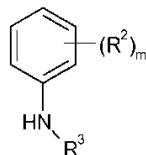
el subíndice m es un número entero de 1 a 5;

el subíndice p es 1 o 2; y

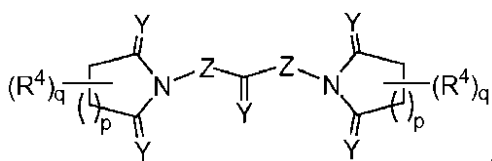
el subíndice q es un número entero de 0 a 4.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un compuesto de la Fórmula Ia o la Fórmula Ib, el método comprende:

poner en contacto un compuesto de la Fórmula IIa o IIb



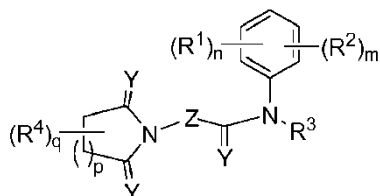
15 en donde los símbolos son como se definen en cualquier reivindicación anterior respectivamente en relación a la Fórmula Ia y la Fórmula Ib, con un compuesto de la Fórmula III:



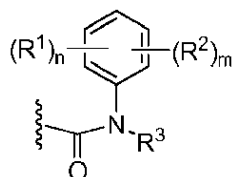
en donde los símbolos son como se definen en cualquier reivindicación anterior, en condiciones suficientes para formar un compuesto de la Fórmula Ia o fórmula Ib.

30 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método de marcaje o para hacer un análisis de N-glicanos, específicamente:

(A) un método para un marcaje rápido fluorescente de N-glicanos para análisis, dicho método comprende: poner en contacto un compuesto de la Fórmula I:



con N-glicanos en condiciones suficientes para formar N-glicanos marcados con un resto:



en donde:

la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula;

55 cada Y es independientemente O= o S=;

Z es -O- o -S-;

60 cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en C₁₋₈alquilo, C₁₋₈heteroalquilo y arilo; opcionalmente, grupos adyacentes R¹ junto con el anillo de benceno al cual se unen para formar un sistema de anillo aromático condensado que se selecciona del grupo que consiste en naftaleno, fenantreno, antraceno, trifenileno y pireno, cada cual tiene de 1 a 4 R⁵ sustituyentes que se selecciona del grupo que consiste en -COOH, -COO-M⁺, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonaalquilo;

cada R² se selecciona independientemente de -CO₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -NO, -N=C=NR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)₂NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b, -C(O)R^a, -C(O)SR^a, -C(S)OR^a, -C(=S)R^a, -S-CN, sulfo, fosfona, fosfonaalquilo y sulfoalquilo, en donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heteroalquilo y haloalquilo u opcionalmente R^a y R^b cuando está unido al mismo átomo de

nitrógeno se combinan para formar un anillo de 5 o 6 miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo que se selecciona de O, N y S;

en donde M^+ se selecciona del grupo que consiste en NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ y Cs^+ ;

R^3 es -H o C_{1-8} alquilo;

5 cada R^4 es independientemente C_{1-8} alquilo;

el subíndice n es un número entero de 0 a 4;

el subíndice m es un número entero de 1 a 5;

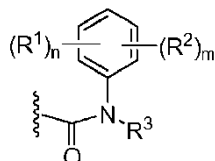
el subíndice p es 1 o 2; y

el subíndice q es un número entero de 0 a 4, o

10

(B) un método de análisis de N-glicanos, dicho método comprende: i) poner en contacto un compuesto de la Fórmula I como se define en la parte (A) de esta reivindicación con N-glicanos en condiciones suficientes para formar N-glicanos marcados, en donde los N-glicanos son marcados con un resto:

15



20

ii) proporcionar los N-glicanos marcados para un medio analítico, y

iii) detectar una señal fluorescente de los N-glicanos marcados;

25

opcionalmente en donde dicho medio analítico se selecciona del grupo que consiste en HPLC, electroforesis capilar en gel y separación microfluida.

Breve descripción de las figuras

30

La Figura 1 muestra el perfil de HPLC del marcaje fluorescente de N-glicanos 4-AASC IgG policlonal humana desialilada.

La Figura 2 muestra el perfil de HPLC del marcaje fluorescente de N-glicanos 4-AASC sialilados de fetuina bovina.

35

La Figura 3 muestra la electroforesis asistida en gel de fluoróforo (FACE) del marcaje fluorescente de N-glicanos APTS-N-hidroxisuccinimidilo carbamato sialilados de fetuina bovina.

La Figura 4 muestra los resultados de la comparación del marcaje fluorescente rápido de N-glicanos liberados de IgG policlonal humana, mediante el uso de 4-aminobenzamidilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato, (4-ABSC), en donde el marcaje se llevó a cabo antes o después de la elución de N-glicanos liberados por desglicosilación en placa de microtitulación de 96 pocillos.

40

La Figura 5 muestra una comparación lado a lado del área máxima del pico de los perfiles de HPLC del marcaje de N-glicanos 4-aminobenzamidilo- N-hidroxisuccinimidil carbamato (4-ABSC) liberados de múltiples alícuotas de Asialotransferrina mediante el uso de desglicosilación en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos.

45

La Figura 6 muestra una comparación lado a lado del área máxima del pico de los perfiles de HPLC del marcaje de N-glicanos 4-aminobenzoilo- N-hidroxisuccinimidilo carbamato (4-ABSC) liberados de múltiples alícuotas de Asialotransferrina mediante el uso de desglicosilación en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos.

50

La Figura 7 muestra una comparación del intervalo del área del pico de los perfiles de marcaje de N-glicanos con 2-aminobenzamida (2-AB), 4-aminobenzamidilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (4-ABSC) o 4-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (4- AASC).

55

La Figura 8 muestra una comparación del marcaje 4-AASC (superior) y 4-ABSC (inferior) de N-glicanos de IgG policlonal humana por cromatografía de interacción hidrofílica HPLC en columna HPLC Glycosep N-Plus.

Descripción detallada de la invención

60

I. Definiciones

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C_{1-8} significa de uno a ocho carbonos). Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, secbutilo, tercbutilo, pentilo, isoamilo, hexilo, octilo, noilo y los isómeros. Para cada una las definiciones en la

65

presente descripción (por ejemplo, alquilo, alcoxi, haloalquilo, sulfoalquilo, fosfonoalquilo), cuando un prefijo no se incluido para indicar el número de átomos de carbono de cadena en una porción alquilo, el radical o porción del mismo tendrá ocho o menos de la cadena principal de átomos de carbono.

5 El término "cicloalquilo" se refiere a anillos de hidrocarburo que tienen el número indicado de átomos en el anillo (*por ejemplo*, C₃₋₆cicloalquilo) y que está totalmente saturado o que no tiene más de un enlace doble entre los vértices del anillo. El cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilos. Uno o dos átomos de C pueden estar opcionalmente reemplazados por un grupo carbonilo. Además, se entiende que "cicloalquilo" se refiere a anillos de hidrocarburos bicíclicos y policíclicos tales como, por ejemplo, biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano, etc.

10 Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a los grupos alquilos unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino, o un átomo de azufre, respectivamente. Además, para los grupos dialquilamino, las porciones alquilo pueden ser iguales o diferentes y además pueden combinarse para formar un anillo de 3 a 7 miembros con el átomo de nitrógeno al que cada uno está unido. De acuerdo con ello, un grupo que se representa como -NR'R" se entiende que incluye piperidinilo, pirrolidinilo, morfolinilo, azetidino y similares.

20 El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un grupo poliinsaturado, grupo hidrocarburo típicamente aromático, que contiene de 6 a 12 átomos en el anillo, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (hasta tres anillos) que están fusionados juntos o unidos covalentemente, en donde al menos uno de los anillos condensados que comprende un radical bicíclico es aromático. Más específicamente el término arilo incluye, pero no se limita a, fenilo, naftilo, bifenilo, antraceno, fenantreno, pirenilo, indanilo (que incluye, por ejemplo, indan-5-ilo, o indan-2-ilo, y similares) o tetrahidronaftilo (que incluye, por ejemplo, tetrahidronaft-1-ilo, o tetrahidronaft-2-ilo, y similares), y similares.

25 El término "arilalquilo" significa un radical alquilo, como se define en la presente descripción, sustituido con al menos uno, preferentemente uno o dos, grupos arilo como se define en la presente descripción, por ejemplo, bencilo o fenetilo, y similares.

30 "Halo" significa fluoro, cloro, bromo, y yodo, preferentemente fluoro o cloro.

"Haloalquilo" significa un radical alquilo, como se define en la presente descripción, sustituido con al menos uno, preferentemente de uno a cinco átomos de halógeno, preferentemente flúor o cloro, que incluyen los sustituidos con halógenos diferentes, por ejemplo, -CH₂Cl, -CF₃, -CHF₂, -CF₂CF₃, -CF(CH₃)₃, o -CHFCl, y similares.

35 El término "heteroalquilo," por si mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, una cadena recta o ramificada o radical de hidrocarburo cíclico, o combinaciones de estos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El(los) heteroátomo(s) de O, N y S pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo de Si puede colocarse en cualquier posición del grupo heteroalquilo, que incluye la posición en la cual el grupo alquilo se une al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -Si(CH₃)₃, y -CH₂-CH=N-OCH₃. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tal como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃.

45 Como se usa en la presente descripción, el término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cinco heteroátomos que se seleccionan de N, O, y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el átomo(s) de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos de grupos arilo no limitantes incluyen fenilo, naftilo y bifenilo, mientras que los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo incluyen piridilo, piridazinilo, pirazinilo, pirimidinilo, triazinilo, quinolinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, benzotriazinilo, purinilo, bencimidazolilo, benzopirazolilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, isobenzofurilo, isoindolilo, indolizino, benzotriazinilo, tienopiridinilo, tienopirimidinilo, pirazolopirimidinilo, imidazopiridinas, benzothiazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, indolilo, quinolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, pirazolilo, indazolilo, pteridinilo, imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, pirrolilo, tiazolilo, furilo, tienilo y similares.

55 Como se usa en la presente descripción, el término "ácido barbitúrico opcionalmente sustituido" significa un radical de ácido barbitúrico, en donde uno o más átomos de nitrógeno son sustituidos opcionalmente con alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo o haloalquilo como se define en la presente descripción.

60 Como se usa en la presente descripción, el término "ácido tiobarbitúrico opcionalmente sustituido" significa un radical de ácido tiobarbitúrico, en donde uno o más átomos de nitrógeno son sustituidos opcionalmente con alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo o haloalquilo como se define en la presente descripción.

65 Como se usa en la presente descripción, el término "glicano" significa polisacárido u oligosacárido.

aproximadamente 250 a aproximadamente 450. Los compuestos puede ser aromáticos monocíclicos o compuestos aromáticos de múltiples anillos condensados. Los compuestos aromáticos de múltiples anillos condensados pueden tener 2, 3, o 4 anillos aromáticos carbocíclicos condensados. Para mejorar la resolución, los compuestos son preferentemente aromáticos monocíclicos. Los sustituyentes se seleccionan de tal manera que los compuestos tienen cierta solubilidad en agua.

En la Fórmula I, Y se selecciona entre oxígeno o azufre. Preferentemente, Y es oxígeno.

En la Fórmula I, Z es oxígeno o azufre. Preferentemente, Z es oxígeno. En otra modalidad, Z es azufre. Aun en otra modalidad, Y y Z son oxígeno, p es 1 y q es 0.

En la Fórmula I y dentro de cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción, R¹ se selecciona del grupo que consiste en C₁₋₈alquilo, heteroalquilo y arilo, opcionalmente, grupos adyacente R¹ junto con los átomos a los que están unidos forman un sistema de anillo aromático carbocíclico condensado que tiene de 1 a 4 R⁵ sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en -COOH, -COOM⁺, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonoalquilo. M⁺ se selecciona del grupo que consiste en NH₄⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ y Cs⁺. En algunas modalidades, el sistema de anillo aromático carbocíclico condensado tiene de 1 a 3 anillos de benceno condensados. En otras modalidades, el sistema de anillo aromático carbocíclico condensado se selecciona del grupo que consiste en naftaleno, fenantreno, antraceno, trifenileno y pireno. En una modalidad, R¹ es C₁₋₆alquilo, se sustituye opcionalmente con 1 a 3 miembros que se seleccionan de -OR^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)R^d, -OC(O)NR^{dR^e}, -SR^d, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂NR^{dR^e}, -NR^dS(O)₂R^e, -C(O)NR^{dR^e}, -C(O)R^d, -C(=S)R^d, -NR^dC(O)R^d, -NR^dC(O)NR^{dR^e}, -CO₂R^d, -NR^dCO₂R^e, -CN, -NO₂, -N(R^d)₂, -NR^dS(O)NR^{dR^e}, -NR^{dR^e}C(=NR^e)NR^{dR^e}, -N₃, -NR^d-OR^e, -N=C=O, -N=C=S, -NR^d-NR^{dR^e}, -NR^dC(O)NR^dNR^{dR^e}, -NO, -N=C=NR^d o -S-CN, en donde R^c, R^d y cada R^e es independientemente C₁₋₈alquilo o arilo. En otra modalidad, R¹ es C₁₋₈heteroalquilo.

En una modalidad, el arilo en R¹ es fenilo que opcionalmente se sustituye con entre 1 a 3 miembros que se selecciona del grupo que consiste en C₁₋₈alquilo, -OR^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)R^d, -OC(O)NR^{dR^e}, -SR^d, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂NR^{dR^e}, -NR^dS(O)₂R^e, -C(O)NR^{dR^e}, -C(O)R^d, -C(=S)R^d, -NR^dC(O)R^d, -NR^dC(O)NR^{dR^e}, -CO₂R^d, -NR^dCO₂R^e, -CN, -NO₂, -N(R^d)₂, -NR^dS(O)NR^{dR^e}, -NR^{dR^e}C(=NR^e)NR^{dR^e}, -N₃, -NR^d-OR^e, -N=C=O, -N=C=S, -NR^d-NR^{dR^e}, -NR^dC(O)NR^dNR^{dR^e}, -NO, -N=C=NR^d y -S-CN.

En compuestos que tienen la Fórmula I y dentro de cualquiera de las modalidades descritas en la presente descripción, R² es un grupo aceptor de electrones. Ejemplos no limitantes de grupos aceptores de electrones incluyen -CO₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -NO, -N=C=NR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)₂NR^{aR^b}, -C(O)NR^{aR^b}, -C(O)R^a, -C(O)SR^a, -C(S)OR^a, -C(=S)R^a, -S-CN, sulfo, fosfona, fosfonoalquilo y sulfoalquilo, en donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heteroalquilo y haloalquilo u opcionalmente R^a y R^b cuando se une al mismo átomo de nitrógeno se combina para formar un anillo de 4 a 6 miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo que se seleccionan de entre O, N y S. En ciertos ejemplos, R² se selecciona del grupo que consiste en -CO₂R^a, -CONR^{aR^b}, sulfo y fosfona. Por ejemplo, R² es -COOH, -CONH₂, -SO₃H o -PO₃H₂.

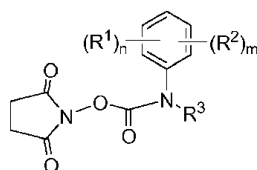
En una modalidad, cada uno de R^a y R^b es independientemente -H, C₁₋₈alquilo, C₁₋₈heteroalquilo, arilo, aril-C₁₋₈alquilo, C₃₋₆cicloalquilo y C₁₋₄haloalquilo, se sustituye opcionalmente con de 1 a 3 C₁₋₈alcoxi, C₁₋₈alquilamino o di(C₁₋₈alquil)amino.

En la Fórmula I, R³ es -H o C₁₋₈alquilo. En una modalidad preferente, R³ es -H. En otra modalidad, R³ es C₁₋₈alquilo, por ejemplo, -CH₃.

En la Fórmula I, cada R⁴ es independientemente C₁₋₈alquilo, el subíndice q es un número entero de 0 a 4. Preferentemente, q es de 0 a 2. Con mayor preferencia, q es 0. En una modalidad preferente, p es 1 y q es 0.

Subfórmulas de la Fórmula I:

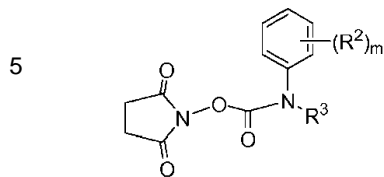
En un grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula Ia:



Ia

los sustituyentes R¹, R² y R³ y los subíndices m y n son como se definió con anterioridad en los compuestos de la Fórmula I y cualquiera de las modalidades de los compuestos de la Fórmula I. En algunas modalidades de los compuestos que tienen la Fórmula (Ia), R³ es -H.

En un segundo grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula Ib:

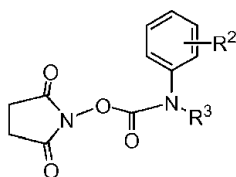


10

Los sustituyentes R^2 , R^3 y los subíndices m y n son como se definió con anterioridad en los compuestos de la Fórmula I y cualquiera de las modalidades de los compuestos de la Fórmula I. En algunas modalidades, R^3 es -H.

En un tercer grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula Ic:

15



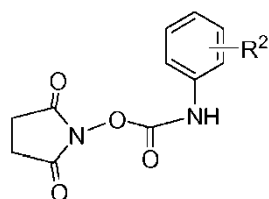
25

Los sustituyentes R^2 , R^3 son como se definió con anterioridad en los compuestos de la Fórmula I y cualquiera de las modalidades de los compuestos de la Fórmula I. En algunas modalidades, R^3 es -H.

30

En un cuarto grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula Id:

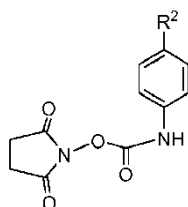
35



45

En ciertos ejemplos, la presente invención proporciona compuestos que tienen fórmula Id-1:

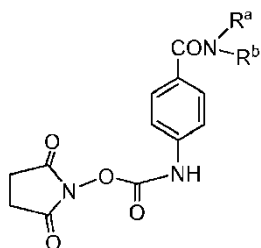
50



60

El sustituyente es como se definió con anterioridad en los compuestos de la Fórmula I y cualquiera de las modalidades de los compuestos de la Fórmula I. En algunas modalidades, la presente invención proporciona compuestos que tienen fórmula (Id-2):

65

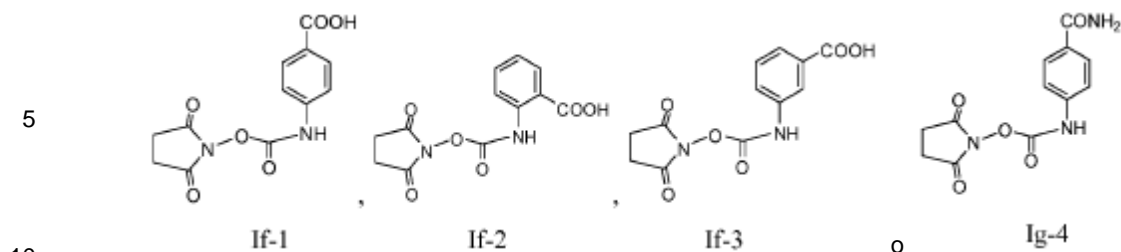


75

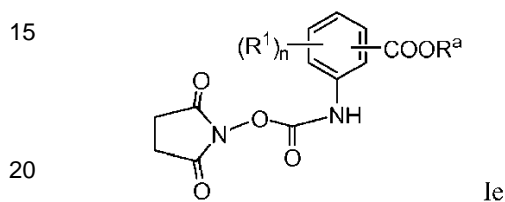
en donde cada R^a y R^b son independientemente -H, C_{1-6} alquilo, arilo o arilalquilo. En ciertos ejemplos, R^a y R^b son -H.

En una modalidad, el compuesto de la Fórmula I tiene una subfórmula de If-1 a If-3 y Ig-4 se selecciona de:

80

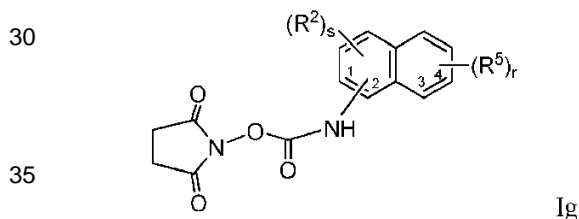


En un quinto grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula Ie:

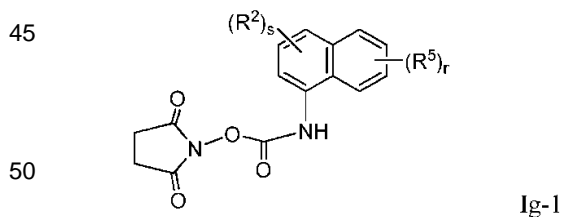


en donde los sustituyentes R^1 y R^a son como se definió con anterioridad en los compuestos de la Fórmula I y cualquiera de las modalidades de los compuestos de la Fórmula I.

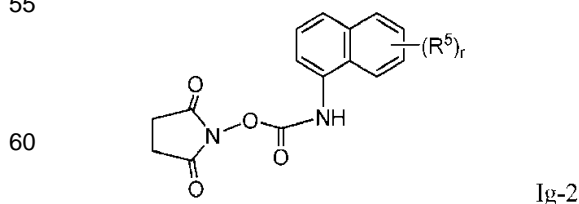
En un sexto grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula Ig:



en donde cada uno de R^2 y R^5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-COOH$, $-COO-M^+$, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonaalquilo; r es un número entero de 0 a 4; y s es un número entero de 0 a 3, con la condición de que r y s no sean simultáneamente 0. En algunas modalidades, la suma de r y s está entre 1 y 4. En ciertos ejemplos, el enlace $-NH-$ se une covalentemente al carbono 1, al carbono 2, al carbono 3 o al carbono 4 del anillo de naftaleno. En otra modalidad, los compuestos de la Fórmula I tienen subfórmula Ig-1:



En algunas modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen subfórmula Ig-2:

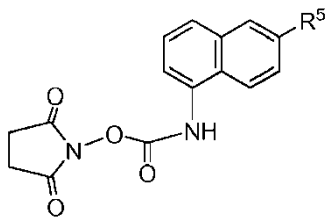


en donde R^5 y r son como se definieron anteriormente. En ciertos ejemplos, r es 1 o 2 y R^5 es $-COOH$, $-COO-M^+$, sulfo,

sulfoalquilo, fosfona o fosfonoalquilo, en donde M^+ es H^+ , NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ o Cs^+ . En otros ejemplos, r es 1 o 2 y R^2 es sulfo.

En algunas modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen subfórmula Ig-3:

5

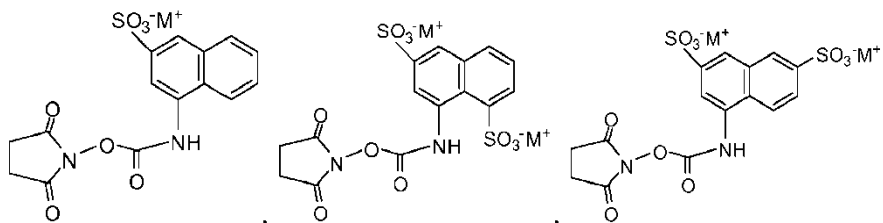


Ig-3

15 en donde s -COOH, -COO M^+ , sulfo, sulfoalquilo, fosfona o fosfonoalquilo, en donde M^+ es H^+ , NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ o Cs^+ . En ciertos ejemplos, R^5 es -SO $_3M^+$, en donde M^+ es H^+ , NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ o Cs^+ .

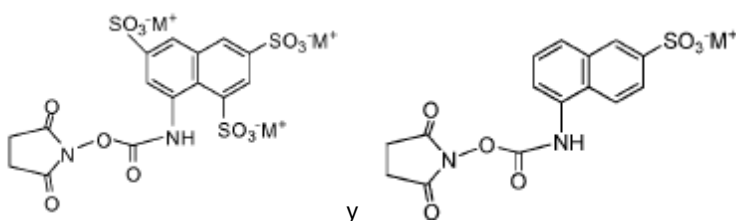
En ciertos ejemplos, los compuestos de la Fórmula Ig-1 se seleccionan del grupo que consiste en:

20



25

30



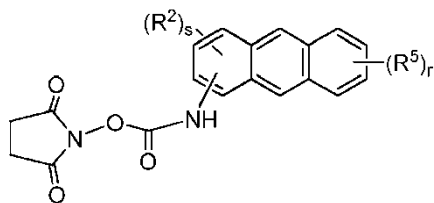
35

40

en donde M^+ es H^+ , NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ o Cs^+ .

En un séptimo grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula Ih:

45

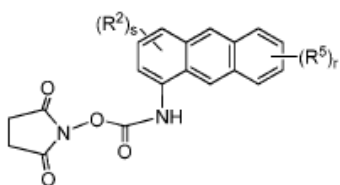


Ih,

50

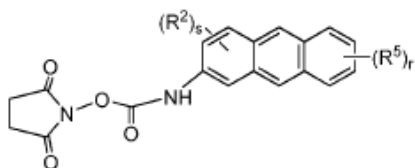
55 en donde cada uno de R^2 y R^5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en -COOH, -COO M^+ , sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonoalquilo; r es un número entero de 0 a 4; y s es un número entero de 0 a 3, con la condición de que r y s no sean simultáneamente 0. En algunas modalidades, los compuestos de la Fórmula Ih tienen subfórmula Ih-1 o Ih-2:

60



Ih-1

60



Ih-2

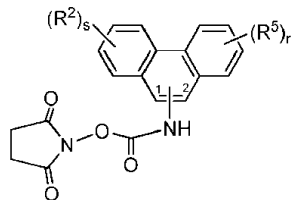
65

o

En ciertos ejemplos, R^2 y R^5 son $-\text{COOH}$, $-\text{COO}^+\text{M}^+$, sulfo o fosfona, en donde M^+ es NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ o Cs^+ . En una circunstancia, R^2 y R^5 son sulfo.

En un octavo grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula li:

5



li

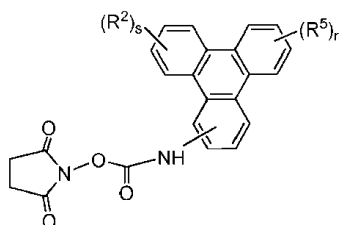
10

15 en donde cada uno de R^2 y R^5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{COO}^+\text{M}^+$, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonaalquilo; r es un número entero de 0 a 4; y s es un número entero de 0 a 3, con la condición de que r y s no sean simultáneamente 0. En una modalidad, s y r son 0. En algunas modalidades, la suma de r y s está entre 1 y 4. En otra modalidad, r es 1, 2, 3 o 4; s es 1, 2 o 3; y R^2 y R^5 son un miembro que se selecciona del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{COO}^+\text{M}^+$, sulfo y fosfona. M^+ es NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ o Cs^+ . En ciertos ejemplos, el enlace $-\text{NH}-$ se une covalentemente al carbono 1 o al carbono 2, del anillo aromático.

20

En un noveno grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula lj:

25

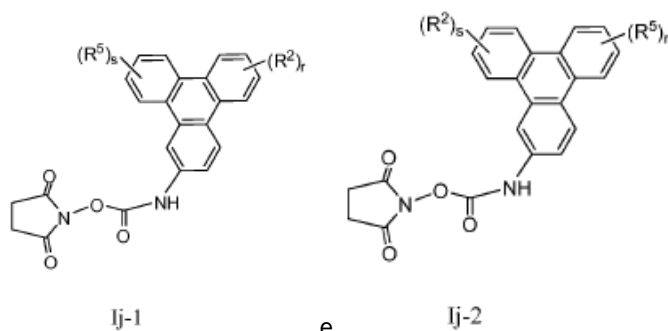


lj,

30

35 en donde cada uno de R^2 y R^5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{COO}^+\text{M}^+$, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonaalquilo; r es un número entero de 0 a 4; y s es un número entero de 0 a 3, con la condición de que r y s no sean simultáneamente 0. En una modalidad, los compuestos de subfórmula lj se seleccionan del grupo que consiste en:

40



lj-1

e

lj-2

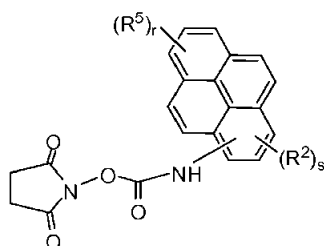
45

50

En ciertos ejemplos, R^2 y R^5 son sulfo o fosfona.

En un décimo grupo de modalidades, los compuestos de la Fórmula I tienen la subfórmula lk:

55

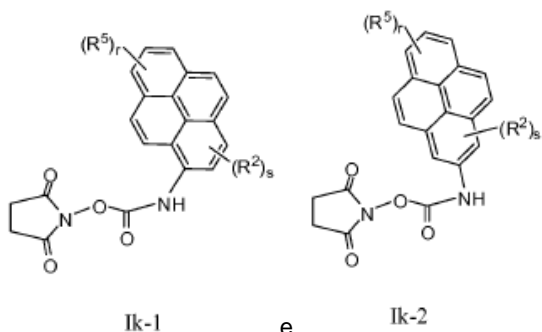


lk

60

65

en donde cada uno de R^2 y R^5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-COOH$, $-COO-M^+$, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonaalquilo; r es un número entero de 0 a 4; y s es un número entero de 0 a 3, con la condición de que r y s no sean simultáneamente 0. En algunas modalidades, la suma de r y s está entre 1 y 4. En una modalidad, los compuestos de subfórmula Ik se seleccionan del grupo que consiste en:



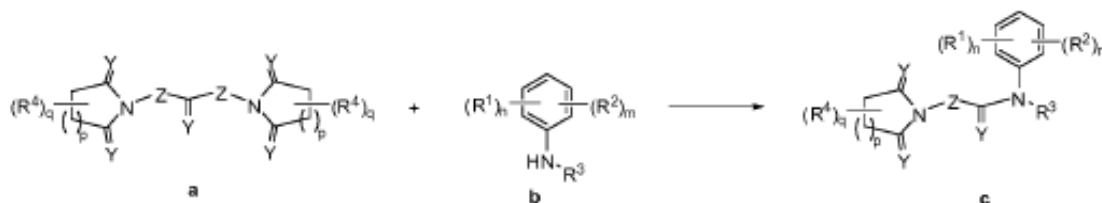
20 En ciertos ejemplos, $r = 2$, $s = 1$. En otros ciertos ejemplos, R^2 y R^5 son grupos sulfo. En aún otros ciertos ejemplos, $r = 2$, $s = 1$ y R^2 y R^5 son grupos sulfo.

IV. Métodos

25 En una modalidad, el método comprende además: la separación de los compuestos de la Fórmula I. En algunas modalidades preferidas, q es 0, p es 1, Y es $=O$, Z es $-O-$, y R^3 es $-H$.

30 Como se muestra en los ejemplos anteriores, hay una variedad de rutas sintéticas mediante las cuales un experto en la técnica puede preparar compuestos e intermedios de la presente invención. El siguiente esquema proporciona ciertas rutas sintéticas que pueden seguirse para acceder a todos los compuestos de la presente invención. Otras rutas o la modificación de las rutas que se presentan a continuación serían fácilmente evidentes para un experto en la técnica y dentro del alcance de la presente invención. El esquema 1 ilustra un enfoque para la síntesis de compuestos de la Fórmula I.

Esquema 1



45 En una modalidad, pueden usarse varios disolventes en la síntesis de los compuestos de la Fórmula I. Ejemplos no limitantes de disolventes incluyen disolventes apróticos, tales como, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), THF, éter, dioxano; disolventes clorados, tales como diclorometano, dicloroetano y cloroformo; disolventes próticos, tales como agua, metanol, etanol e isopropanol; disolventes de hidrocarburos, tales como hexanos, éter de petróleo, benceno, tolueno y xileno. Una mezcla de los disolventes anteriores además puede usarse en la síntesis de los compuestos de la Fórmula I. La mezcla de disolventes puede tener varias relaciones. Por ejemplo, disolvente de dos componentes mezclados pueden tener una relación en volumen de aproximadamente 1:10 a 10:1, tal como 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 y 1:10. Preferentemente, los disolventes mixtos incluyen disolventes de diferentes polaridades.

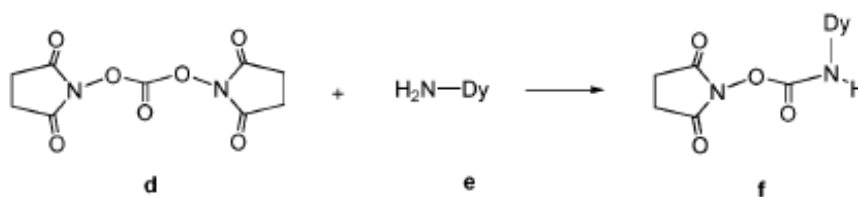
55 Las reacciones pueden llevarse a cabo en varias condiciones. Preferentemente, los disolventes usados son anhidros. Varias relaciones de reactivos pueden usarse. En una modalidad, los compuestos de la Fórmula II y los compuestos de la Fórmula III reaccionan en una relación molar de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 5:1, por ejemplo, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1 y 5:1. Por ejemplo, los compuestos de la Fórmula II y los compuestos de la Fórmula III reaccionan en una relación molar de aproximadamente 1:1. Los reactivos pueden tener un intervalo de concentración de aproximadamente 0.01 M a aproximadamente 1 M, preferentemente de aproximadamente 0.01 M a aproximadamente 0.5 M. En algunas modalidades, la reacción se lleva a cabo a temperaturas de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 100 °C, preferentemente, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 100 °C, con mayor preferencia de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 85 °C, aún con mayor preferencia, de aproximadamente de 10 °C a 60 °C. En una modalidad, la reacción se lleva a cabo a temperaturas de 22 °C. En otra modalidad, la reacción

se lleva a cabo a temperaturas de 80 °C. En otro ejemplo, la reacción se lleva a cabo por encima del punto de ebullición del disolvente, tal como en condiciones de reflujo. Preferentemente, los reactivos son solubles en los disolventes. En ciertas otras modalidades, además la reacción puede llevarse a cabo, donde los reactivos están en suspensión. En general un material de partida está disponible comercialmente o puede prepararse por reacción de un equivalente de fosgeno o metilcarbonato con un exceso de N-hidroxisuccinimida o N-hidroxitiosuccinamida. La arilamina sustituida **b** puede sintetizarse por sustitución electrofílica de una amina aromática protegida o no protegida mediante el uso de acilación de Friedel Crafts, sulfonación, fosfonación de compuestos aromáticos conocidos en la técnica. Las reacciones de acilación de Friedel-Crafts puede llevarse a cabo por reacción de un compuesto aromático con ácidos carboxílicos o anhídridos (ver, Gore, *Chem. Ind.* (Londres) 1974, 727-731; Larock, *Comprehensive Organic Transformations*; VCH: Nueva York, 1989, p 45-46; Olah, *Friedel-Crafts and Related Reactions*; Wiley: Nueva York, 1963-1964, vol. 1, p 91-115; vol. 3, p1-381; Lengyel, y otros. *Synth. Comm.* 1998, 28, 1891). La reacción de sulfonación puede llevarse a cabo por la reacción de ácido sulfúrico con un compuesto aromático mediante el uso de los procedimientos conocidos en la técnica (ver, Khelevin, *J. Org. Chem. USSR* 1984, 20, 339, 1173, 1723; 1987, 23, 1709; 1988, 24, 535; Gilbert, *Sulfonation and Related Reactions*; Wiley: Nueva York, 1965, p 62-83, 87-124). La reacción de fosfonación de compuestos aromáticos puede llevarse a cabo por reacción de anhídrido fosfórico con un compuesto aromático de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (ver, *J. Am. Chem. Soc.*; 1954; 76(4) pp 1045 - 1051). Típicamente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura elevada.

El método de síntesis de la presente invención tiene varias ventajas, por ejemplo, las reacciones se llevan a cabo en condiciones suaves, compatibles con varios grupos funcionales y ofrecer productos con alto rendimiento. El método permite la síntesis fácil de compuestos de la Fórmula I que tienen una variedad de grupos que donan y/o aceptan electrones.

Como se muestra en el Esquema 2, el método sintético anterior además es adecuado para la síntesis de diversos colorantes (**f**) que contiene un resto de N-hidroxisuccinimidilo carbamato, donde Dy representa un resto de colorante. NH₂-Dy puede ser cualquier colorante adecuado para el marcaje y detección de glicanos. Ejemplos de estas y otras clases de colorantes adecuados pueden encontrarse en Haugland, y otros, *HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS*, SIXTH ED., Molecular Probes, Eugene, Ore. 1996; Patente de Estados Unidos núm. 3,194,805; 3,128,179; 5,187,288; 5,188,934; 5,227,487, 5,248,782; 5,304,645; 5,433,896; 5,442,045; 5,556,959; 5,583,236; 5,808,044; 5,852,191; 5,986,086; 6,020,481; 6,162,931; 6,180,295; y 6,221,604; Patente EP 1408366; Smith, y otros, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1993, 1195-1204; Whitaker, y otros, *Anal. Biochem.* 207:267-279 (1992); Krasoviskii y Bolotin, *ORGANIC LUMINESCENT MATERIALS*, VCH Publishers, NY., 1988; Zolliger, *COLOR CHEMISTRY*, 2da Edición, VCH Publishers, NY., 1991; Hirschberg, y otros, *Biochemistry* 37:10381-10385 (1998); Fieser y Fieser, *REAGENTS FOR ORGANIC SYNTHESIS*, Volúmenes 1 a 17, Wiley, US, 1995. Geiger, y otros, *Nature* 359:859-861 (1992). Sin embargo, otros colorantes se proporcionan a través de sitios en línea como <http://www.zeiss.com>. Ejemplo de colorantes incluyen, pero no se limitan a, compuestos carbocíclicos aromáticos monocíclico o fusionados, compuestos aromáticos heterocíclicos condensado o monocíclico (por ejemplo, quinolinas amino sustituida y acridinas), colorantes de xanteno, colorantes de cumarina, colorantes dipirrometeneboron difluoruro y colorantes de fenoxazina, cada uno de los cuales contiene uno o más grupos -NH₂.

Esquema 2

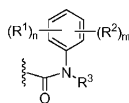


Dy-N-hidroxisuccinimidilo carbamato (**f**) puede prepararse por reacción de di(N-succinimidil) carbonato **d** con un colorante **e** en condiciones de reacción como se describe anteriormente. Generalmente, el colorante **e** tiene un grupo amino reactivo para reaccionar con el di(N-succinimidil) carbonato.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para un marcaje rápido fluorescente de N-glicanos para análisis. El método incluye poner en contacto un colorante de la Fórmula f (Esquema 2) con un N-glicano en condiciones suficientes para formar N-glicanos marcados con restos de -C(O)NH-Dy. El resto Dy puede ser cualquier colorante que tenga una longitud de onda fluorescente detectable. La emisión fluorescente del colorante puede estar en las regiones UV, visible o infrarroja. Por ejemplo, la longitud de onda de emisión fluorescente puede ser de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 1000 nm. Preferentemente, el colorante tiene una longitud de onda de emisión fluorescente de aproximadamente 200-300, 300-350, 350-400, 400-500, 500-600, 600-800 o en la región del IR cercano.

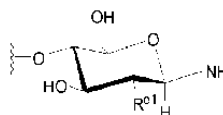
En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para un marcaje rápido fluorescente de N-glicanos

para análisis. El método incluye poner en contacto un compuesto de cualquiera de las fórmulas I, Ia, Ib, Ic, Id, Id-1, Id-2, le, lf-1, lf-2, lf-3, lg, lg-1, lg-2, lg-3, lg-4, lh, lh-1, lh-2, li, lj-1, lj-2, lk, lk-1 e lk-2 con N-glicanos en condiciones suficientes para formar N-glicanos marcados con un resto:



en donde R^1 , R^2 , R^3 , m y n son como se define anteriormente y la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

En una modalidad, los N-glicanos son liberados de la escisión de las glicoproteínas por una enzima. Varios métodos conocidos en la técnica pueden utilizarse para generar N-glicanos de la glicoproteína a través de procesos de desglicosilación. Ejemplos de glicoproteínas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fetuina bovina (ver, análisis HPLC en la figura 1, figura 2 y en la figura 3). Los N-glicanos pueden ser α - o β -glicosilaminas. En una modalidad, la glicosilamina es una β -glicosilamina que tiene la Fórmula:



en donde R^{e1} es $-\text{OH}$ o $-\text{NHC(O)CH}_3$ y R^f es $-\text{H}$ o C_{1-8} alquilo. Preferentemente, R^1 es $-\text{H}$. Las enzimas usadas en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, péptido-N4- (acetil- β -glucosaminilo) amidasa -asparagina y PNGasa F. En una modalidad, las reacciones se llevan a cabo en presencia de detergentes y/o reductores. Ejemplo de detergentes incluyen detergente no iónico, dodecil sulfato sódico, y el detergente no iónico Triton X-100. Ejemplo de reductores incluyen el β -mercaptoetanol. Alternativamente, pueden usarse NaBH_4 y Pd/H_2 .

Las reacciones de marcaje puede llevarse a cabo a temperaturas de aproximadamente 0°C a aproximadamente 60°C , preferentemente, de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C , con mayor preferencia de aproximadamente 15°C a aproximadamente 35°C , aun con mayor preferencia de aproximadamente 18°C a aproximadamente 30°C . En algunas modalidades preferidas, la reacción se lleva a cabo a temperaturas de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 grados Celsius.

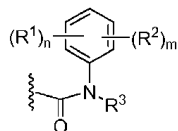
Las reacciones de marcaje pueden llevarse a cabo en diversas condiciones. En una modalidad, las reacciones se llevan a cabo en una solución acuosa. En otra modalidad, la reacción puede llevarse a cabo en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes tal como se define con anterioridad. En aún otra modalidad, las reacciones pueden llevarse a cabo en disolventes mixtos, tales como una mezcla de agua y disolvente orgánico en una relación predeterminada, por ejemplo, el disolvente mixto puede ser agua y un disolvente como se discutió anteriormente.

Las reacciones de marcaje pueden realizarse además en una amplia gama de condiciones de pH. En una modalidad, las reacciones se llevan a cabo a pH de menos de 7, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, tal como un pH de aproximadamente 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 o 7.0. En otra modalidad, las reacciones se llevan a cabo en una solución básica con un pH mayor de 7. En aun otra modalidad, la reacción se lleva a cabo a un pH de 7.0. Preferentemente, la reacción se lleva a cabo a un pH elevado. El pH puede ser de aproximadamente 7.1 a aproximadamente 12, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.9, 9.0, 9.1, 9.3, 9.4, 9.5, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, o 12.

Las reacciones de marcaje se llevan a cabo típicamente poniendo en contacto los reactivos de aproximadamente 1 milisegundo a aproximadamente 15 minutos o 0.5 milisegundos a aproximadamente 10 minutos. En algunas modalidades, el tiempo de reacción es de aproximadamente 0.5 ms a 1 ms, 1 ms a 10 ms, 10 ms a 50 ms, 50 ms a 100 ms, 100 ms a 200 ms, 200 ms a 500 ms, 500 ms a 1 s, 1 s a 5 s, 5 s a aproximadamente 10 s, 10 s a 20 s, 20 s a 40 s, 40 s a 60 s, 60 s a 80 s, 80 s a 150 s, 150 s a 200 s, 200s a 500s, 500 s a 1 minutos, 0.5 s a 15 minutos, y 0.5 minutos a aproximadamente 10 minutos. En una modalidad, las reacciones se completan en aproximadamente 1 min a aproximadamente 10 min. En algunos ejemplos, el tiempo de reacción es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 ms. En otros ejemplos, el tiempo de reacción es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 s. En aún otros ejemplos, el tiempo de reacción es de aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos.

El método de marcaje de la presente invención permite el marcaje *in situ* N-glicanos, por ejemplo, poniendo en contacto un compuesto de cualquiera de las fórmulas I, Ia, Ib, Ic, Id, Id-1, Id-2, le, lf-1, lf-2, lf-3, lg, lg-1, lg-2, lg-3, lg-4, lh, lh-1, lh-2, li, lj-1, lj-2, lk, lk-1 y lk-2 con N-glicanos liberados de las glicoproteínas. En una modalidad, las reacciones de marcaje pueden llevarse a cabo antes, durante o después de la etapa de elución, por ejemplo, los N-glicanos liberados se eluyen directamente en una placa colectora que contiene alícuotas de reactivo de marcaje rápido que contiene un compuesto de cualquiera de las fórmulas I, Ia, Ib, Ic, Id, Id-1, Id-2, le, lf-1, lf-2, lf-3, lg, lg-1, lg-2, lg-3, lg-4, lh, lh-1, lh-2, li, lj-1, lj-2, lk, lk-1 y lk-2. Como tal, la presente invención proporciona la preparación fácil y eficiente de las muestras para el análisis.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un método de análisis de N-glicanos. El método incluye i) poner en contacto un compuesto de cualquiera de las fórmulas I, Ia, Ib, Ic, Id, Id-1, Id-2, Ie, If-1, If-2, If-3, Ig, Ig-1, Ig-2, Ig-3, Ig-4, Ih, Ih-1, Ih-2, Ii, Ij-1, Ij-2, Ik, Ik-1 y Ik-2 con N-glicanos en condiciones suficientes para formar N-glicanos marcados, en donde los N-glicanos se marcan con un resto:



10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ii) proporcionar los N-glicanos marcados a un medio de análisis; y iii) detectar una señal fluorescente a partir de los N-glicanos marcados, en donde R^1 , R^2 , R^3 , m y n se definen como anteriormente y la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula.

Los medios de análisis pueden ser cualquier instrumentación que adecuada para la detección y el análisis de N-glicanos marcados. Típicamente, los medios de análisis incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar (CE), electroforesis en gel de hidratos de carbono, los tipos de microfluidos de separación, espectrometría de masas y similares. En una modalidad, se usa la cromatografía líquida. Las técnicas de cromatografía líquida incluyen, pero no se limitan a, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase normal o de fase inversa, cromatografía en fase normal acuosa (además conocida como cromatografía de interacción hidrófila), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad y cromatografía en capa fina. En una modalidad, el medio de análisis es HPLC. En aún otra modalidad, el medio de análisis es la electroforesis capilar en gel, la separación de microfluidos y la espectrometría de masas.

Típicamente, los compuestos de la presente invención se disuelven en un disolvente y se proporcionan para un medio de análisis. La muestra puede aplicarse por inyección o por adición directa a un medio de análisis. Por ejemplo, las muestras pueden añadirse a través de una jeringa. En una modalidad, la señal fluorescente emitida por los N-glicanos marcados tiene una longitud de onda menor que 400 nm. En otra modalidad, los N-glicanos marcados emiten una señal que tiene una longitud de onda en el intervalo de 400-700 nm. Aun en otra modalidad, los N-glicanos marcados emiten una señal que tiene una longitud de onda en el intervalo del infrarrojo cercano, tal como en el intervalo de 700-1000 nm.

El uso de carbamatos activados fluorescentes, tales como compuestos de fórmulas I, Ia, Ib, Ic, Id, Id-1, Id-2, Ie, If-1, If-2, If-3, Ig, Ig-1, Ig-2, Ig-3, Ig-4, Ih, Ih-1, Ih-2, Ii, Ij-1, Ij-2, Ik, Ik-1 o Ik-2, ofrece una serie de ventajas significativas sobre otros procesos de marcaje en base a la aminación reductora y a otros métodos conocidos de marcaje fluorescente de glicosilaminas. En primer lugar, la presente invención proporciona la preparación eficiente de muestras con tiempo de preparación de muestras mínimo para el marcaje fluorescente. El procedimiento estándar para el análisis de glicanos liberados de glicoproteínas requiere que los glicanos sean purificados, a menudo por procedimientos de múltiples etapas, de proteína desglicosilada, de tampones y reactivos usados durante la desglicosilación y del secado a fondo durante varias horas antes del marcaje por aminación reductora. Por el contrario, el marcaje mediante el uso de carbamatos activados fluorescentes puede proceder en condiciones acuosas y no requiere que los N-glicanos se purifiquen o se sequen. El marcaje puede realizarse directamente en toda la muestra, y la desglicosilación se realiza en condiciones nativas o en condiciones desnaturalizantes en presencia de detergentes y/o reductores. En segundo lugar, la presente invención proporciona el marcaje fácil de N-glicanos con el tiempo mínimo requerido para el marcaje de los N-glicanos. Por ejemplo, el marcaje a base de aminación reductora requiere intervalos de tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a varias horas (típicamente 2-3 horas). En comparación, el marcaje de los N-glicanos con carbamatos activados fluorescentes se completa en minutos. En tercer lugar, la presente invención proporciona el marcaje de N-glicanos con una degradación mínima de los glicanos durante el proceso de marcaje fluorescente. Los procedimientos de marcaje en base a aminación reductora típicamente requieren tiempos de incubación prolongados a temperaturas elevadas y en presencia de catalizadores ácidos. En dependencia de las condiciones específicas de reacción, el marcaje en base a aminación puede resultar en pérdida parcial de ácido siálico de glicanos sialilados. Bajas temperaturas y/o tiempos de incubación reducidos minimiza la posibilidad de desialilación, mientras que altas temperaturas y tiempos de incubación prolongados favorece el marcaje eficiente, pero con incremento de la desialilación. Típicamente, las condiciones seleccionadas para la aminación reductora representan un compromiso entre una alta eficiencia de marcaje y una mínima desialilación. Por el contrario, el de marcaje de N-glicanos con carbamatos activados fluorescentes procede sin ninguna desialilación de glicanos sialilados. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la estabilidad de N-glicanos en el presente proceso de marcaje es atribuible al uso de condiciones de reacción muy suaves, que incluyen cambios relativamente suaves en el pH y temperaturas de reacción bajas, así como el relativamente corto tiempo durante el cual la reacción de marcaje se produce en comparación con las técnicas estándares. Por ejemplo, la reacción se completa en minutos. Por otra parte, la presente invención ofrece una gran ventaja sobre los procesos de marcaje en base a aminación reductora o procedimientos de marcaje en que el pH de la reacción se vuelve ácido sobre el marcaje de los glicanos; por ejemplo, el marcaje de glicosilaminas con FMOC-CL resulta en la generación de ácido clorhídrico.

V. Ejemplos

Las siguientes abreviaturas se usan en los ejemplos y durante toda la descripción de la invención:

- 5 DMSO: dimetilsulfóxido
 DMF: N,N-dimetilformamida
 DMA: N,N-dimetilacetamida
 4-AASC: 4-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato
 THF: tetrahidrofurano
 10 APTS: ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico
 HPLC - cromatografía líquida de alto rendimiento
 ANTS: ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico
 DSC: di(N-succinimidil) carbonato
 FMOC: fluorenilmetoxicarbonilo
 15 2-AB: 2-aminobenzamida
 4-ABSC: 4-aminobenzamidilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato
 APTSSC: ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato
 ANTSSC: ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato
 ANSASC: ácido 5-amino-2-naftalenosulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato

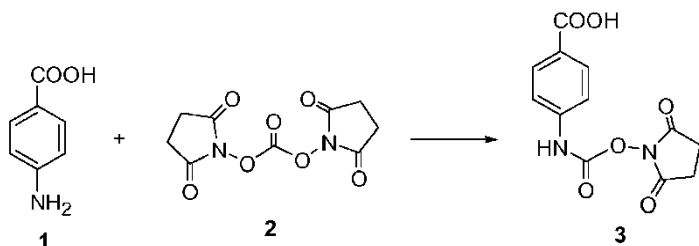
20 Los ejemplos son para fines ilustrativos y la invención no esta limitada a los ejemplos descritos.

Ejemplo 1

25 Síntesis de 4-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (4-AASC).

25

30



35

El ejemplo ilustra la síntesis de un derivado de ácido 4-aminobenzoico, 4-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (3).

40 El compuesto 3 (4-AASC) se prepara en base a un protocolo modificado desarrollado para la síntesis de 6-aminoquinolilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (Cohen y otros. *Analytical Biochemistry* 211,279-287, 1993). El di(N-succinimidil) carbonato 2 (DSC, 6 mmol, 1.5 g) se disuelve en 50 ml de acetonitrilo anhidro y se calienta a reflujo. El ácido 4-aminobenzoico 1 (4-AA, 5 mmol, 0.686 g) se disuelve en 25 ml de acetonitrilo anhidro y se añade gradualmente a la solución de carbonato a reflujo. La reacción se mantiene a reflujo durante 1h. Después 1h, se evapora aproximadamente 1/3 del volumen de acetonitrilo, la solución resultante se enfría a -20 °C y se deja durante varios días. El precipitado resultante se filtra y se lava con acetonitrilo frío. El compuesto 3 aislado (rendimiento > 85 %) se seca al vacío y se guarda en un desecador a temperatura ambiente. H¹ NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 12.84 (1H, br), 11.19 (1H, s), 7.98 (2H, d), 7.59 (2H, d), 2.88 (4H, s).

50 Ejemplo 2

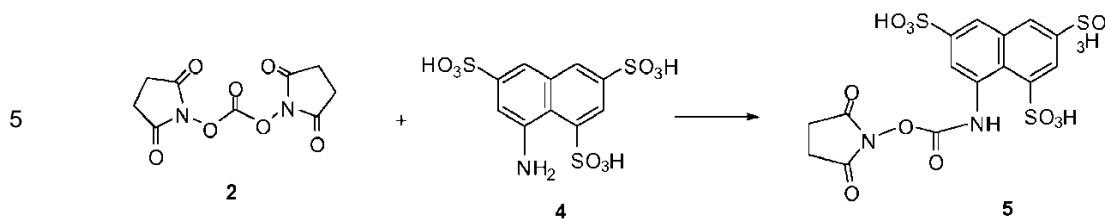
Síntesis de 3-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato.

55 El compuesto 3-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato se prepara de acuerdo con el procedimiento mostrado en el Ejemplo 1 por la reacción del ácido 3-aminobenzoico (Registro CAS No.: 99-05-8) con di(N-succinimidil) carbonato.

Ejemplo 3

60 Síntesis del ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato.

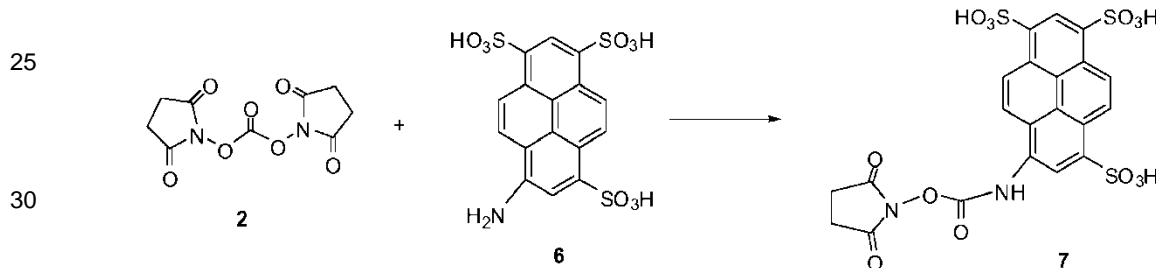
65



15 El compuesto 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato (**5**) se prepara mediante el uso del procedimiento similar como se ilustra en el Ejemplo 1. El di(N-succinimidil) carbonato **2** (DSC, 6 mmol, 1.5 g) se disuelve en 50 ml de acetonitrilo anhidro y se calienta a reflujo. El ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico **4** (ANTS, 5 mmol, 1.92 g) se disuelve en 30 ml de acetonitrilo anhidro y se añade gradualmente a la solución de carbonato a reflujo. La reacción se mantiene a reflujo durante 1h. Después de 1h, se evapora aproximadamente 1/3 del volumen de acetonitrilo, la solución resultante se enfría a -20 °C y se deja durante varios días. El precipitado resultante se filtra y se lava con acetonitrilo frío. El compuesto 5 aislado se seca al vacío y se guarda en un desecador a temperatura ambiente. El rendimiento es mayor que 80 %.

20 Ejemplo 4

Síntesis del ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato (APTSSC).

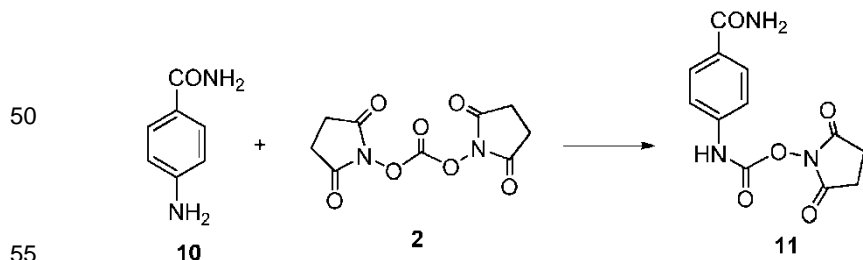


35 El compuesto 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato (**7**) se prepara en base a similar procedimiento como se ilustra en el Ejemplo 1. El di(N-succinimidil) carbonato **2** (DSC, 0.019 mmol, 10 mg) y el ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico **6** (APTS, 0.022 mmol, 5.7 mg) se disuelven en 2.5 ml de la mezcla que contiene 1ml of acetona anhidra, 1ml de DMF anhidro y 0.5 ml de DMSO anhidro. La reacción se somete a ultrasonidos brevemente y luego se agita durante la noche a temperatura ambiente, en la oscuridad. Después de una noche, la mezcla de reacción se concentra a aproximadamente 0.5 ml mediante el uso de un evaporador centrífugo al vacío y las alícuotas se almacenan a -20 °C. La mezcla de reacción que contiene carbamato APTS-N-hidroxisuccinimidilo crudo se usó para experimentos de marcaje sin purificación adicional.

40

Ejemplo 5

45 Síntesis de 4-aminobenzamido-N-hidroxisuccinimidil carbamato (4-ABSC).



60 El compuesto **11** (4-ABSC) se prepara en base a un protocolo modificado desarrollado para la síntesis de 6-aminoquinolilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (Cohen y otros. Analytical Biochemistry 211,279-287, 1993) y se sintetiza de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1. El di(N-succinimidil) carbonato **2** (DSC, 6 mmol, 1.5 g) se disuelve en 50 ml de acetonitrilo anhidro y se calienta a reflujo. Se disuelve 4-aminobenzamida **10** (5 mmol, 0.681 g) en 25 ml de acetonitrilo anhidro y se añade gradualmente a la solución de carbonato a reflujo. La reacción se mantiene a reflujo durante 1h. Después de 1h, ~ se evapora aproximadamente 1/3 del volumen de acetonitrilo, la solución resultante se enfría a -20 °C y se deja durante varios días. El precipitado resultante se filtra y se lava con acetonitrilo frío. El compuesto **11** aislado se seca al vacío y se guarda en un desecador a temperatura ambiente (rendimiento > 80 %). ^1H NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 11.13 (1H, s), 7.87 (3H, m), 7.51 (2H, d), 7.33 (1H, s), 2.82 (4H, s).

65

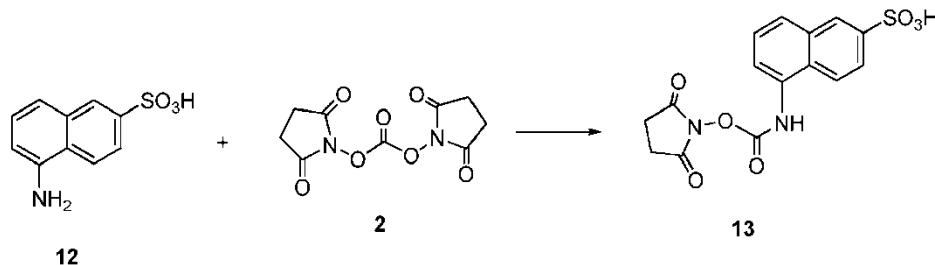
Ejemplo 6

Síntesis de ácido 5-amino-2-naftalenosulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato.

5

10

15



El compuesto **13** (ANSASC) se prepara en base a un protocolo modificado desarrollado para la síntesis de 6-aminoquinolilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (Cohen y otros. *Analytical Biochemistry* 211,279-287, 1993) y se sintetiza de acuerdo con el procedimiento de los Ejemplos 1 y 6. El di(N-succinimidil) carbonato **2** (DSC, 6 mmol, 1.5 g) se disuelve en 50 ml de acetonitrilo anhidro y se calienta a reflujo. El ácido 5-amino-2-naftalenosulfónico **12** (5 mmol, 1.116 g) se disuelve en 30 ml de acetonitrilo anhidro y se añade gradualmente a la solución de carbonato a reflujo. La reacción se mantiene a reflujo durante 1h. Después de 1h, ~ se evapora 1/3 del volumen de acetonitrilo, la solución resultante se enfría a -20 °C y se deja durante varios días. El precipitado resultante se filtra y se lava con acetonitrilo frío. El compuesto **13** aislado se seca al vacío y se guarda en un desecador a temperatura ambiente (rendimiento > 80 %). ^1H NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 9.15 (1H, s), 8.35 (1H, d), 7.63 (1H, m), 7.57 (1H, m), 7.38 (1H, m), 7.29 (1H, m), 6.98 (1H, d), 2.64 (4H, s), 2.0 (1H, s). ^{13}C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 169.0, 152.2, 141.0, 140.5, 133.2, 128.6, 126.4, 125.0, 123.2, 121.5, 119.8, 106.7, 25.6.

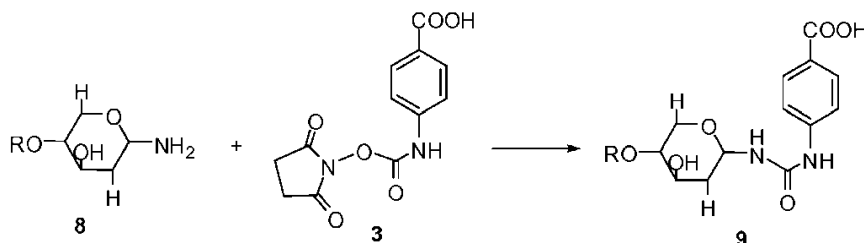
30

Ejemplo 7

Reacción del compuesto 3 con β -glicosilaminas.

35

40



β -glicosilamina **8** se hace reaccionar con 4-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (4-AASC) **3**. La reacción procede rápidamente en un ambiente acuoso, a temperatura ambiente y el reactivo sin reaccionar se descompone rápidamente para liberar el ácido 4-aminobenzoico, N-hidroxisuccinimida y dióxido de carbono.

50

Ejemplo 8

Reacción del compuesto 5 con β -glicosilaminas.

β -glicosilamina **8** se hace reaccionar con 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico-N-hidroxisuccinimidil carbamato(**5**). La reacción procede rápidamente en un ambiente acuoso, a temperatura ambiente y el reactivo sin reaccionar se descompone rápidamente para liberar el ácido 4-aminobenzoico, N-hidroxisuccinimida y dióxido de carbono.

55

Ejemplo 9

Reacción de APTS-N-hidroxisuccinimidilo carbamato (7) con β -glicosilaminas.

Fetuna bovina (~100 μg , que contiene glicanos sialilados mayormente con carga negativa) se desglicosila a pH 8.6 en condiciones nativas mediante el uso de la enzima PNGasa F. Glicosilaminas liberadas (volumen total ~ 50 μl) se marcaron mediante el uso de APTS-N-hidroxisuccinimidilo carbamato reactivo (10 μl , ~5 minutos, a temperatura ambiente). Las alícuotas de muestra marcada se analizaron por electroforesis en gel asistida de carbohidratos fluoróforo (FACE), mediante el uso de un gel de ligando N-. La Figura 3 muestra el perfil de gel de N-glicanos en duplicado de fetuna bovina.

65

Ejemplo 10

4-AASC marcados de N-glicanos liberados de la glicoproteína de ensayo en condiciones nativas y de desnaturalización.

5 IgG policlonal humana desialilada (~100 µg, que contiene glicanos no cargados) o de fetuina bovina (~100 µg, que contiene glicanos sialilados mayormente con carga negativa) se desglicosila a pH 8.6 en condiciones nativas mediante el uso de la enzima PNGasa F. Glicosilaminas liberadas se marcan mediante el uso de 4-AASC reactivo (2-5 minutos, temperatura ambiente, ~10 mg 4-AASC/ml de acetonitrilo) y se analizan directamente mediante cromatografía de interacción hidrofílica en columna Glycosep N HPLC. La Figura 1 muestra el perfil de HPLC de N-glicanos de IgG humana y la Figura 2 muestra el perfil de HPLC de N-glicanos de fetuina bovina.

Ejemplo 11

15 Marcaje fluorescente de N-glicanos mediante el uso de 4-aminobenzamidilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (4-ABSC).

Con la incorporación de marcaje fluorescente rápida en la desglicosilación enzimática, una gran etapa limitante de la velocidad en perfiles de glicanos puede potencialmente eliminarse.

Protocolo de rápido marcaje

20 Al término de la desglicosilación enzimática con PNGasa F:

- Disolver el colorante rápido a una concentración de 50 mg/ml en una solución de DMF/75 % de acetonitrilo al 25 % (el Reactivo de Rápido Marcaje).
- Eluir directamente las β-glicosilaminas liberadas en una placa colectora que contiene alícuotas de Reactivo de Rápido Marcaje.
- Realizar la limpieza luego del marcaje.
- Perfilar las muestras por HPLC.

Realizar el marcaje rápido con 4-ABSC en β-glicosilaminas liberadas enzimáticamente de IgG policlonal humana

30 Desglicosilar rápidamente la IgG policlonal humana en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos mediante el uso de PNGasa F y las β-glicosilaminas que se eluyen en dos placas de microtitulación separadas. Eluir el primer conjunto de muestras en una placa de microtitulación vacía. Adicionar el Reactivo de marcaje rápido a las muestras con la pipeta mediante el uso de dos cantidades diferentes a fin de llevar a cabo el rápido marcaje. Añadir 5 µl a cada pocillo de una fila y 10 µl a la otra. Eluir el segundo conjunto de muestras en una placa de microtitulación que contiene 5 µl o 10 µl de cantidades de Reactivo de Rápido Marcaje.

40 Después de la separación en la columna N-Plus, el área máxima del pico para ambos conjuntos de muestras y las dos cantidades de Reactivo de Marcaje se plotean como se muestra en la figura 4. Los resultados verifican que el marcaje rápido durante la elución es tan eficiente como el marcaje convencional por una pipeta después de la elución. Adicionalmente, 5 µl de colorante muestra ser suficiente para el marcaje apropiado.

El marcaje rápido fluorescente mediante el uso de 4-CASB realiza en β-glicosilaminas la liberación enzimática de asialotransferrina

45 La asialotransferrina se desglicosila enzimáticamente mediante el uso de PNGasa F y las β-glicosilaminas eluidas en una placa de microtitulación que contiene 5 µl del Reactivo de marcaje rápido en cada pocillo. Después de la separación en la columna N-Plus, el área máxima del pico para todas las muestras se plotean como se muestra en la figura 5. Todas las áreas se normalizan en el intervalo, que se representa como un ciento por ciento. La desviación estándar es aproximadamente 5 %. Los resultados acreditan la reproducibilidad del marcaje en un formato de muestreo de alto rendimiento.

Ejemplo 12

55 marcaje rápido fluorescente mediante el uso de 4-aminobenzoilo-N-hidroxisuccinimidil carbamato (4-AASC) en β-glicosilaminas liberadas enzimáticamente de asialotransferrina

60 La asialotransferrina se desglicosila enzimáticamente mediante el uso de PNGasa F y las β-glicosilaminas eluidas en una placa de microtitulación que contiene 5 µl del Reactivo de marcaje rápido en cada pocillo. Después de la separación en la columna N-Plus, el área máxima del pico para todas las muestras se plotean como se muestra en la figura 6. Todas las áreas se normalizan en el intervalo, que se representa como un ciento por ciento. La desviación estándar es aproximadamente 5 %. Los resultados acreditan la reproducibilidad del marcaje en un formato de muestreo de alto rendimiento.

Ejemplo 13

Comparación de las señales de fluorescencia de N-glicanos marcados con 4-ABSC, 4-AASC y 2-AB.

5 Cantidades equivalentes de N-glicanos se marcaron ya sea con 2-AB mediante el uso del protocolo de aminación reductora o con 4-ABSC o 4-AASC mediante el uso del protocolo de rápido marcaje. Después de la limpieza de N-glicanos del exceso de un colorante, alícuotas equivalentes de N-glicanos se analizan por HILIC HPLC con detección de fluorescencia (mediante el uso de longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para tinte dado) y se comparan las áreas de los picos de N-glicanos. Como se muestra en la Figura 7, con el colorante rápido 4-ABSC se logra casi 2.5 veces más señal que con el colorante rápido 4-AASC. Ambos colorantes muestran detección más fuerte que los N-glicanos 2-AB marcados, un método reconocido en la técnica usado en perfiles de glicano. Aunque el colorante rápido 4-AASC es menor en términos de la fluorescencia, el colorante está cargado negativamente. N-glicanos neutros marcados con el colorante rápido 4-AASC tienen la ventaja de analizarse en el modo negativo al mismo tiempo como los N-glicanos sialilados por MALDI.

15 Ejemplo 14

Comparación de los perfiles de HPLC de N-glicanos marcados con 4-AASC y 4- ABSC

20 La Figura 8 muestra una comparación de perfiles de HPLC de N-glicanos marcados con 4-AASC (superior) y 4-ABSC (inferior) de IgG policlonal humana. Los N-glicanos e IgG policlonal humana se liberan enzimáticamente mediante el uso de PNGasa F y sometidos a marcaje fluorescente rápida con colorante 4-ABSC o 4-AASC. Después de la limpieza de N-glicanos del exceso de un colorante, se analizan los N-glicanos por HILIC HPLC con detección de fluorescencia (mediante el uso de longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para tinte dado).

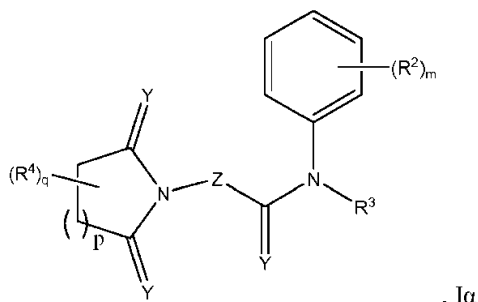
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula I α o de la Fórmula I β más abajo:

5

10

15



, I α

en donde:

cada Y es independientemente O= o S=;

Z es -O- o -S-;

20

cada R² se selecciona independientemente de -CO₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -NO, -N=C=NR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)₂NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b, -C(O)R^a, -C(O)SR^a, -C(S)OR^a, -C(=S)R^a, -S-CN, sulfo, fosfona, fosfonoalquilo y sulfoalquilo, en donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente del grupo que consiste en -H, alquilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heteroalquilo y haloalquilo u opcionalmente R^a y R^b cuando está unido al mismo átomo de nitrógeno se combinan para formar un anillo de 5 o 6 miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo que se selecciona de O, N y S;

25

R³ es -H o C₁₋₈alquilo;

cada R⁴ es independientemente C₁₋₈alquilo;

el subíndice m es un número entero de 1 a 5;

el subíndice p es 1 o 2; y

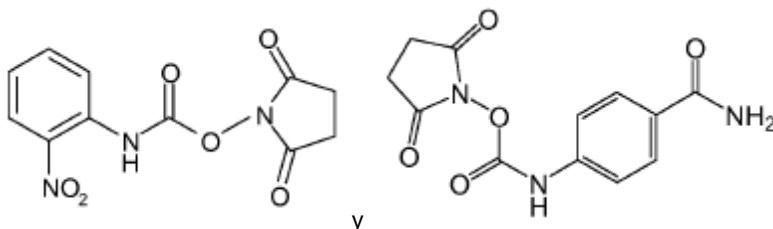
30

el subíndice q es un número entero de 0 a 4,

proporciona que el compuesto no se selecciona de:

35

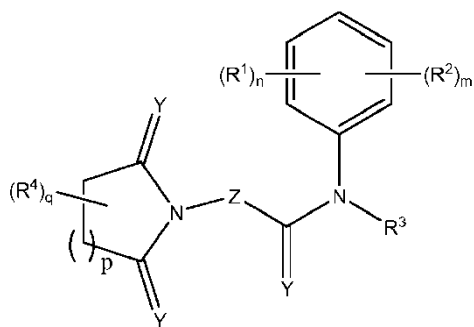
40



y

45

50



I β

55

en donde:

cada Y es independientemente O= o S=;

Z es -O- o -S-;

60

grupos adyacentes R¹ junto con el anillo de benceno al que están unidos forman un sistema de anillo aromático carbocíclico condensado que se selecciona del grupo que consiste en naftaleno, fenantreno, antraceno, trifenileno, y pireno, cada cual tiene de 1 a 4 R⁵ sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en -COOH, -COO-M⁺, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonoalquilo;

65

cada R² se selecciona independientemente de -CO₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -NO, -N=C=NR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)₂NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b, -C(O)R^a, -C(O)SR^a, -C(S)OR^a, -C(=S)R^a, -S-CN, sulfo, fosfona, fosfonoalquilo y sulfoalquilo, en donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente del grupo que consiste

en -H, alquilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heteroalquilo y haloalquilo u opcionalmente R^a y R^b cuando está unido al mismo átomo de nitrógeno se combinan para formar un anillo de 5 o 6 miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo que se selecciona de O, N y S;

en donde M^+ se selecciona del grupo que consiste en NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ y

R^3 es -H o C_{1-8} alquilo;

cada R^4 es independientemente C_{1-8} alquilo;

el subíndice η es un número entero de 0 a 4 que proporciona el compuesto de la Fórmula I β tiene grupos adyacentes R^1 que forman un sistema de anillo carbocíclico condensado como se especifica anteriormente en esta definición de la Fórmula I β ;

el subíndice m es un número entero de 1 a 5;

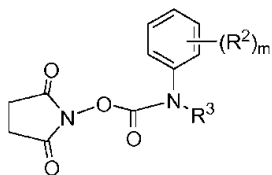
el subíndice p es 1 o 2; y

el subíndice q es un número entero de 0 a 4.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Y es =O y Z es -O-.

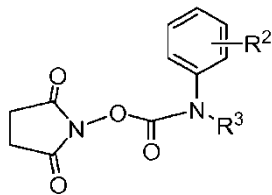
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde p es 1.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la Fórmula Ib:



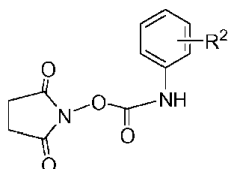
Ib,

y opcionalmente tiene la Fórmula Ic:



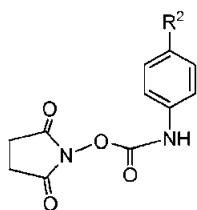
Ic,

por ejemplo tiene la Fórmula Id:



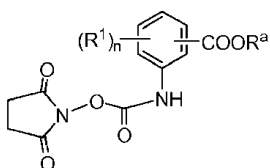
Id

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la Fórmula Id-1:



Id-1.

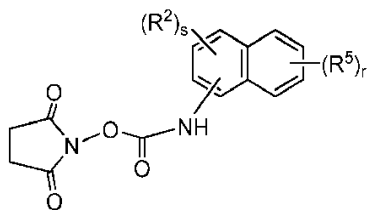
6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la Fórmula Ie:



Ie

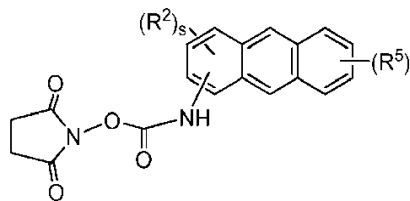
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

5



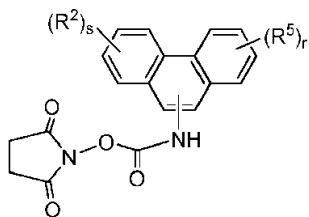
Ig

10



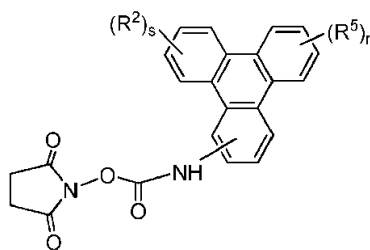
Ih

15



Ii

20

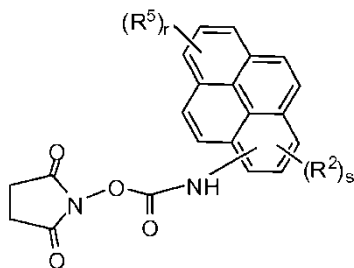


Ij,

25

y

30



Ik

35

en donde

cada uno de R^2 y R^5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en $-COOH$, $-COO^+M^+$, sulfo, fosfona, sulfoalquilo y fosfonaalquilo;

40

cada r es independientemente un número entero de 0 a 2; y

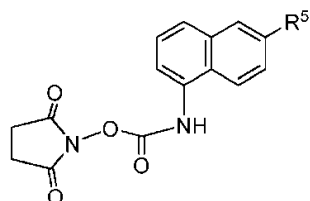
cada s es independientemente un número entero de 0 a 3, con la condición de que r y s no sean simultáneamente 0; y la suma de r y s está entre 1 y 4,

o en donde $s=1$, $r=2$ y cada uno de R^2 y R^5 es un grupo sulfo.

45

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene la Fórmula Ig-3;

50



Ig-3,

55

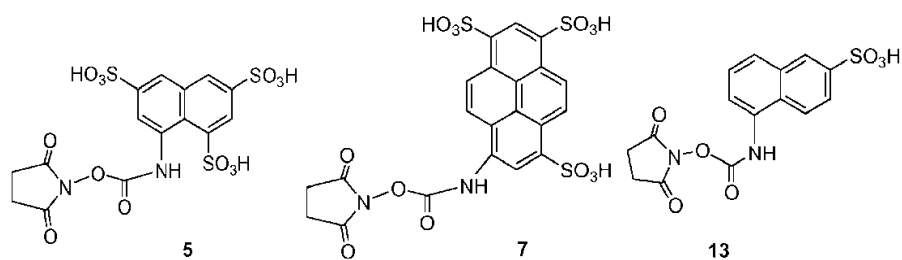
en donde opcionalmente R^5 es sulfo.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en donde $s=1$, $r=2$ y cada R^2 y R^5 es un grupo sulfo.

60

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, que se selecciona de:

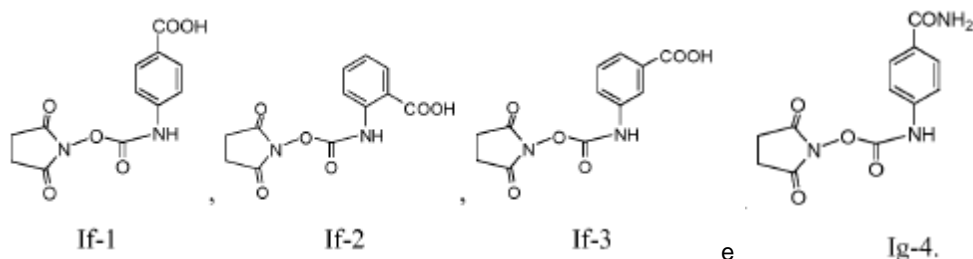
65



5
10

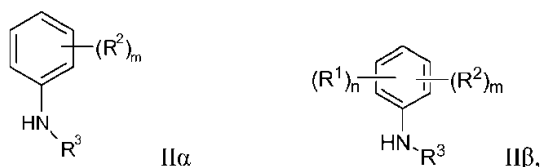
11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde R^2 se selecciona del grupo que consiste en $-CO_2R^a$, $-CN$, $-NO_2$, $-N_3$, $-N=C=O$, $-N=C=S$, $-NO$, $-N=C=NR^a$, $-S(O)R^a$, $-S(O)_2R^a$, $-S(O)_2NR^aR^b$, $-C(O)NR^aR^b$, $-C(O)R^a$, $-C(O)SR^a$, $-C(=S)R^a$ y $-S-CN$.
12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 o de acuerdo con la reivindicación 5, en donde R_2 es $-CO_2R^a$ o $-CONR^aR^b$, y opcionalmente es $-COOH$ o $-CONH_2$.
13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

15
20



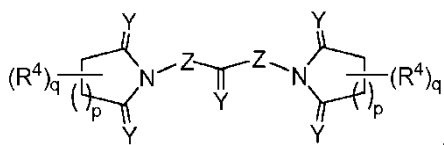
25
30

14. Un método para preparar un compuesto de cualquier reivindicación anterior, que comprende: poner en contacto un compuesto de la Fórmula II α o II β



35
40

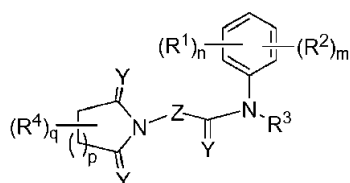
en donde los símbolos son como se definen en cualquier reivindicación anterior respectivamente en relación a la Fórmula Ia y la Fórmula Ib, con un compuesto de la Fórmula III:



45
50

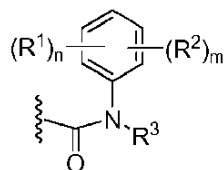
en donde los símbolos son como se definen en cualquier reivindicación anterior, en condiciones suficientes para formar un compuesto de la Fórmula Ia o de la Fórmula Ib.

15. Un método de marcaje o para hacer un análisis de N-glicanos, específicamente: (A) un método para un marcaje rápido fluorescente de N-glicanos para análisis, dicho método comprende: poner en contacto un compuesto de la Fórmula I:



60
65

con N-glicanos en condiciones suficientes para formar N-glicanos marcados con un resto:



en donde:

la línea ondulada indica el punto de unión al resto de la molécula;

15 cada Y es independientemente O= o S=;

Z es -O- o -S-;

20 cada R¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en C₁₋₈alquilo, C₁₋₈heteroalquilo y arilo; opcionalmente, grupos adyacentes R¹ junto con el anillo de benceno al que están unidos forman un sistema de anillo aromático carbocíclico condensado que se selecciona del grupo que consiste en naftaleno, fenantreno, antraceno, trifenileno, y pireno, cada cual tiene de 1 a 4 sustituyentes R⁵ que se seleccionan del grupo que

25 consiste en -COOH, -COO^{M+}, sulfo, sulfoalquilo, fosfona y fosfonoalquilo; cada R² se selecciona independientemente de -CO₂R^a, -CN, -NO₂, -N₃, -N=C=O, -N=C=S, -NO, -N=C=NR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)₂NR^aR^b, -C(O)NR^aR^b, -C(O)R^a, -C(O)SR^a, -C(S)OR^a, -C(=S)R^a, -S-CN, sulfo, fosfona, fosfonoalquilo y sulfoalquilo, en donde cada R^a y R^b se selecciona independientemente del grupo que consiste

30 en -H, alquilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heteroalquilo y haloalquilo u opcionalmente R^a y R^b cuando está unido al mismo átomo de nitrógeno se combinan para formar un anillo de 5 o 6 miembros que tiene de 0 a 2 heteroátomos adicionales como miembros del anillo que se selecciona de O, N y S;

en donde M⁺ se selecciona del grupo que consiste en NH₄⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ y Cs⁺;

R³ es -H o C₁₋₈alquilo;

35 cada R⁴ es independientemente C₁₋₈alquilo;

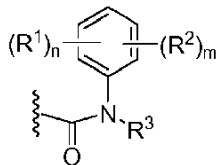
el subíndice n es un número entero de 0 a 4;

el subíndice m es un número entero de 1 a 5;

el subíndice p es 1 o 2; y

el subíndice q es un número entero de 0 a 4, o

40 (B) un método de análisis de N-glicanos, dicho método comprende: i) poner en contacto un compuesto de la Fórmula I como se define en la parte (A) de esta reivindicación con N-glicanos en condiciones suficientes para formar N-glicanos marcados, en donde los N-glicanos son marcados con un resto:

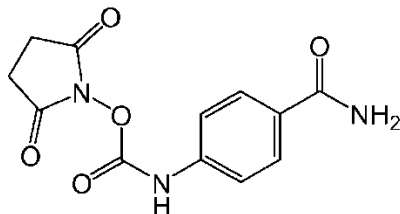


ii) proporcionar los N-glicanos marcados para un medio analítico, y

iii) detectar una señal fluorescente de los N-glicanos marcados;

50 opcionalmente en donde dicho medio analítico se selecciona del grupo que consiste en HPLC, electroforesis capilar en gel y separación microfluida.

16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el compuesto de la Fórmula I es



17. Un método de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde los N-glicanos se marcan fluorescentemente seguido de la liberación enzimática de los N-glicanos de un glicano en condiciones nativas o en condiciones desnaturizantes, opcionalmente en donde el marcaje se realiza durante la recogida de los N-glicanos liberados, con lo que se eliminan las etapas de incubación con marcado y secado.

65

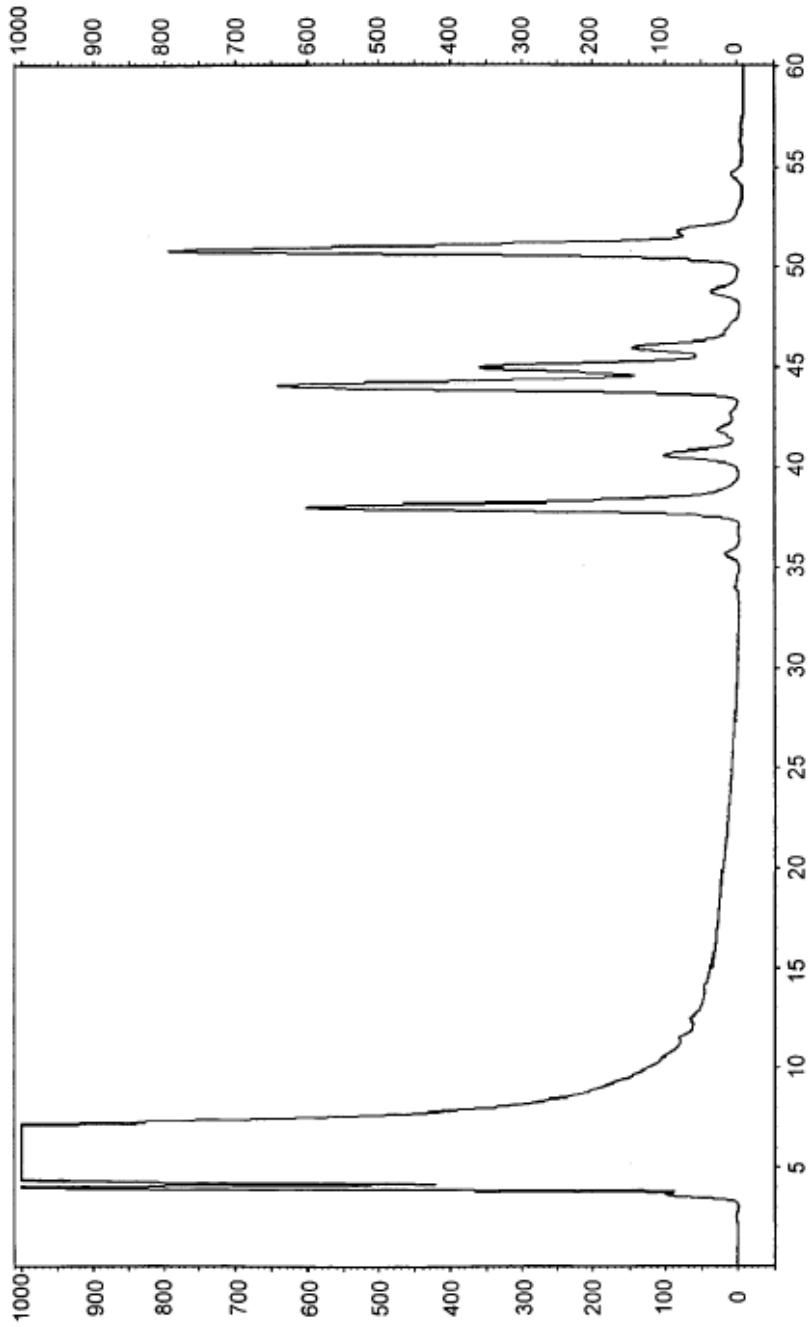


FIG. 1

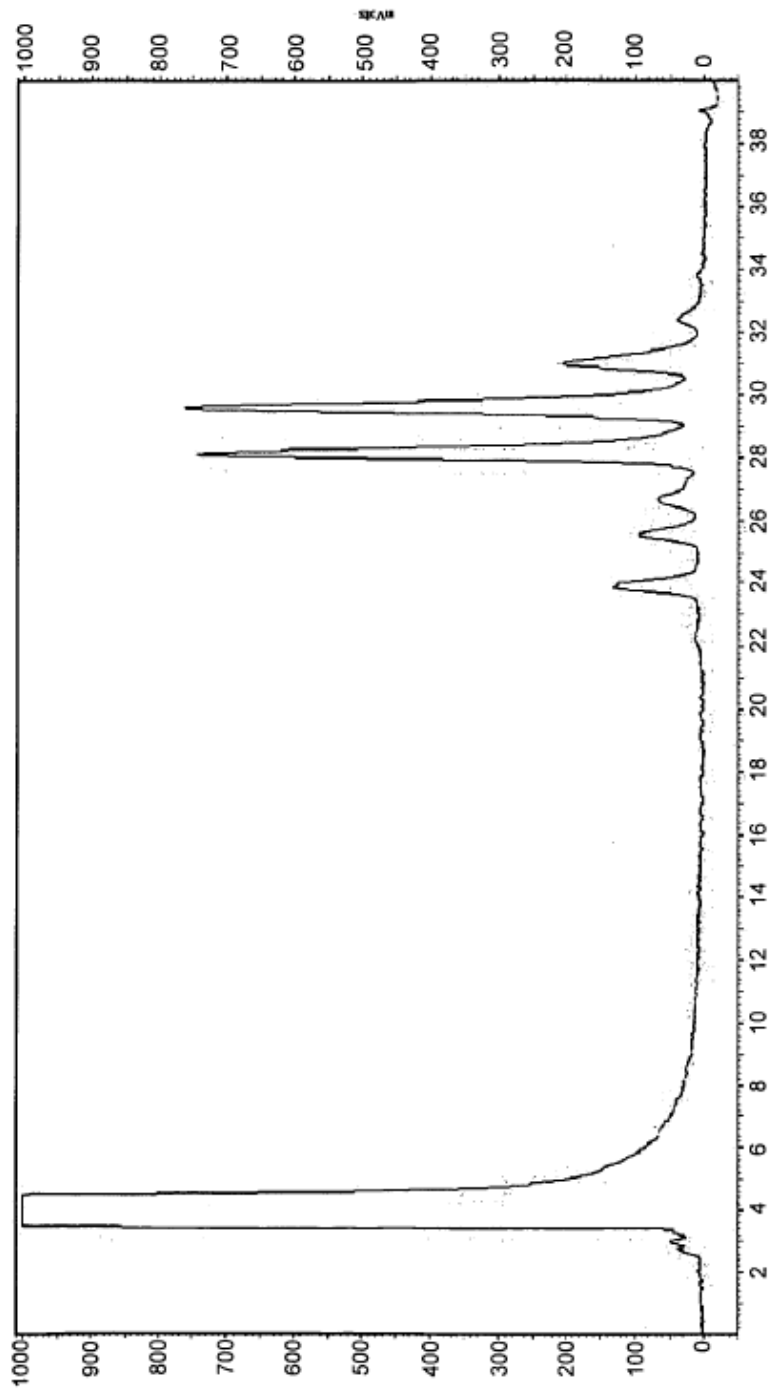


FIG. 2

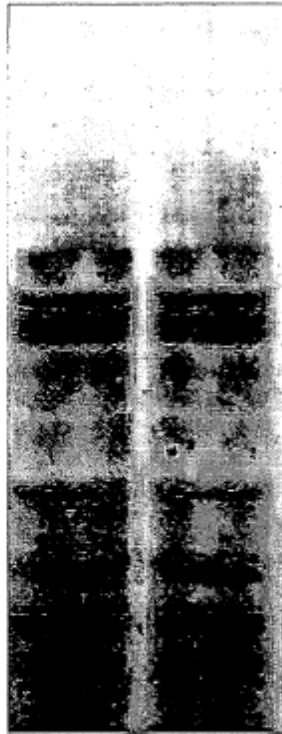


FIG. 3

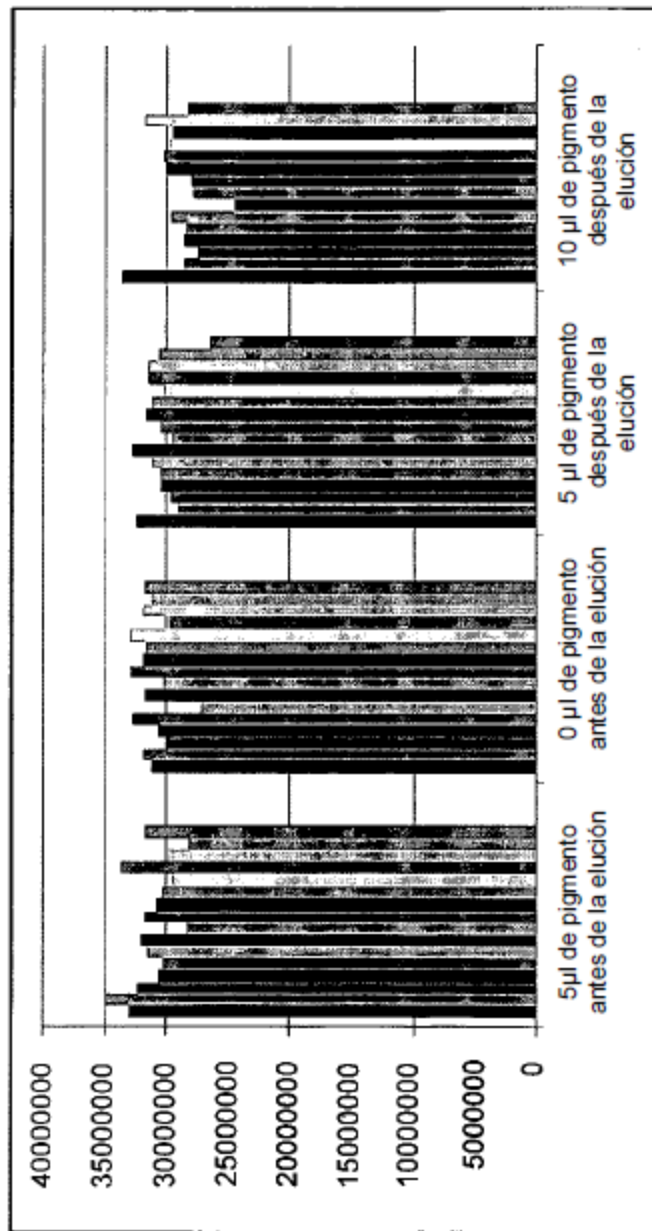


FIG. 4

Asialotransferrina RDK (formato de 96 pocillos) marcado con Pigmento Instantáneo # 1

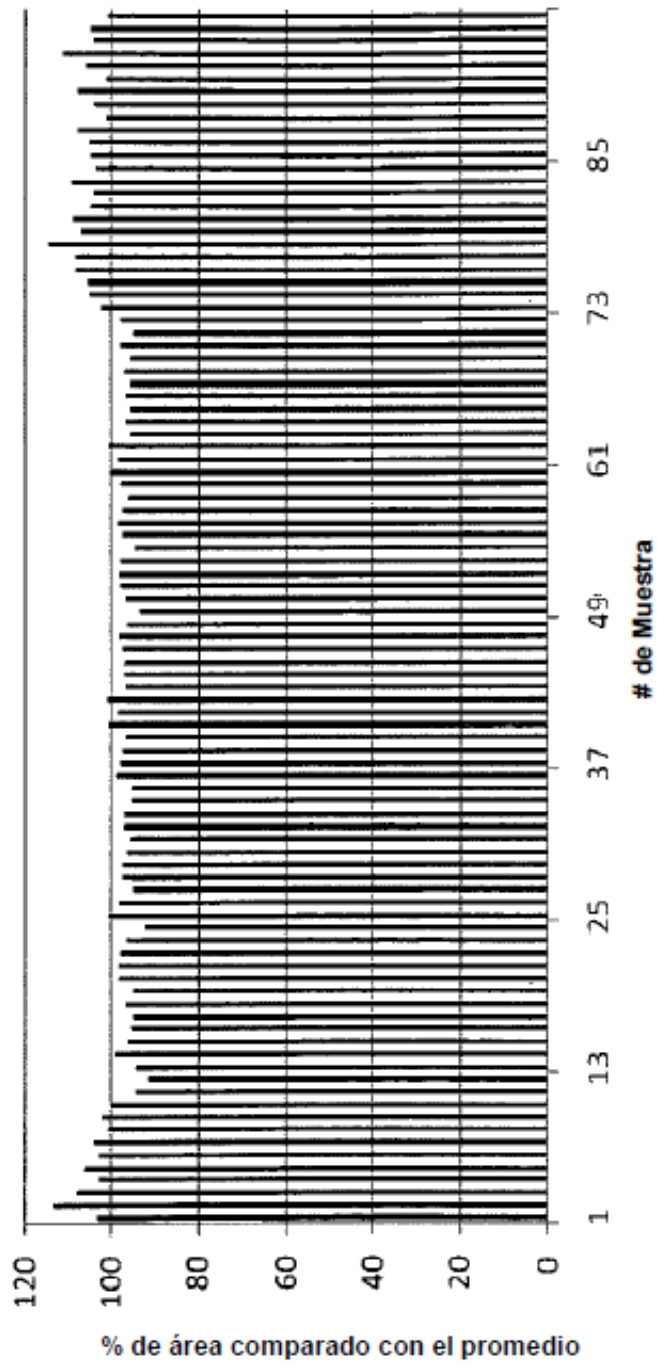


FIG. 5

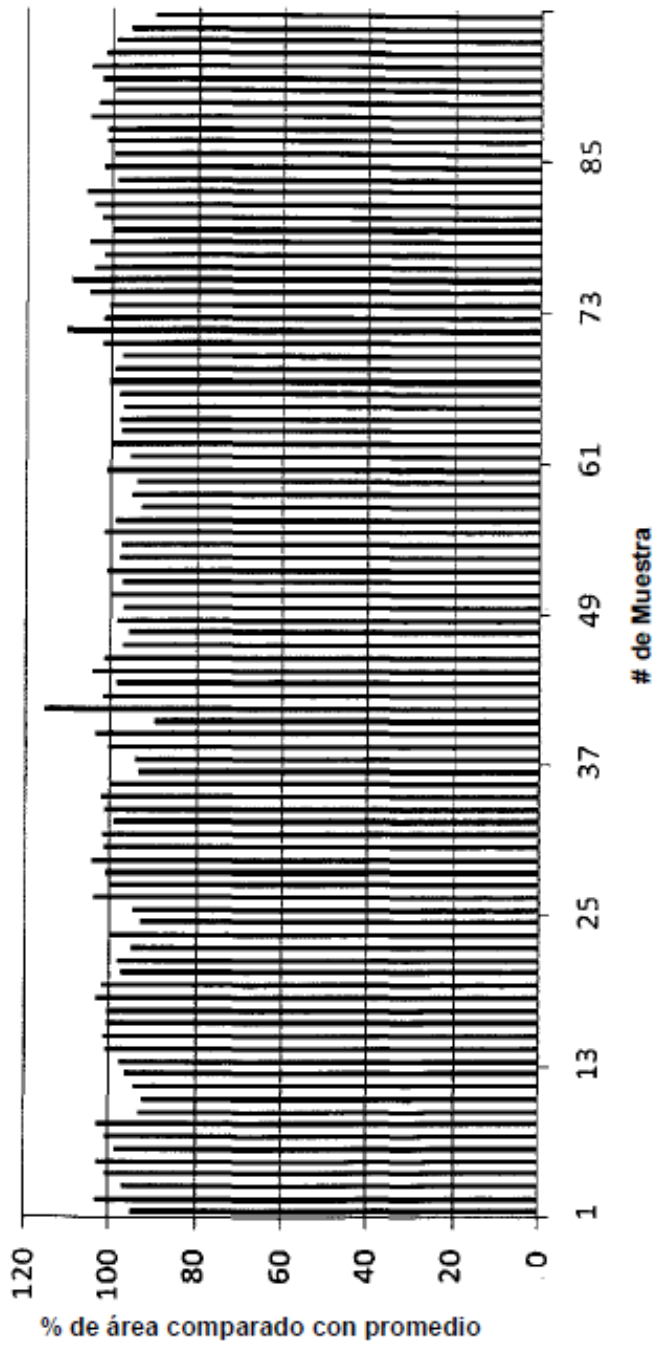


FIG. 6

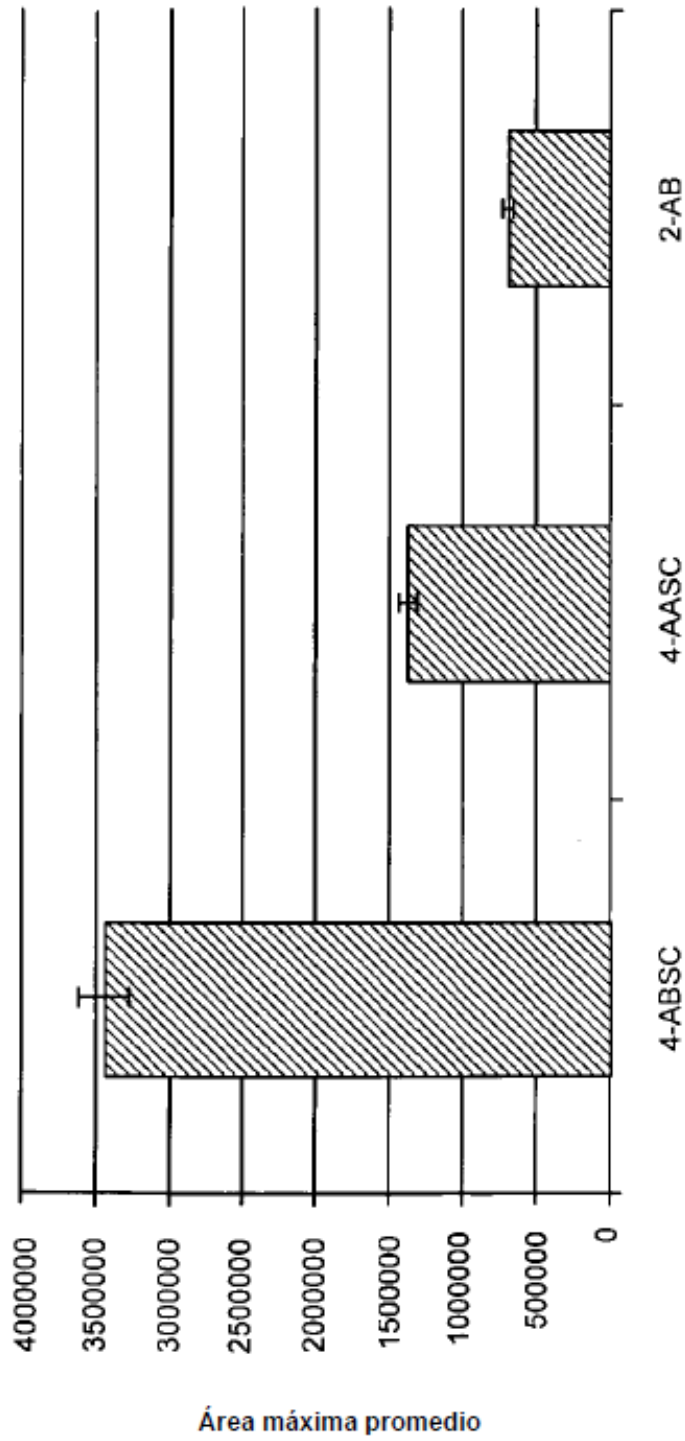


FIG. 7

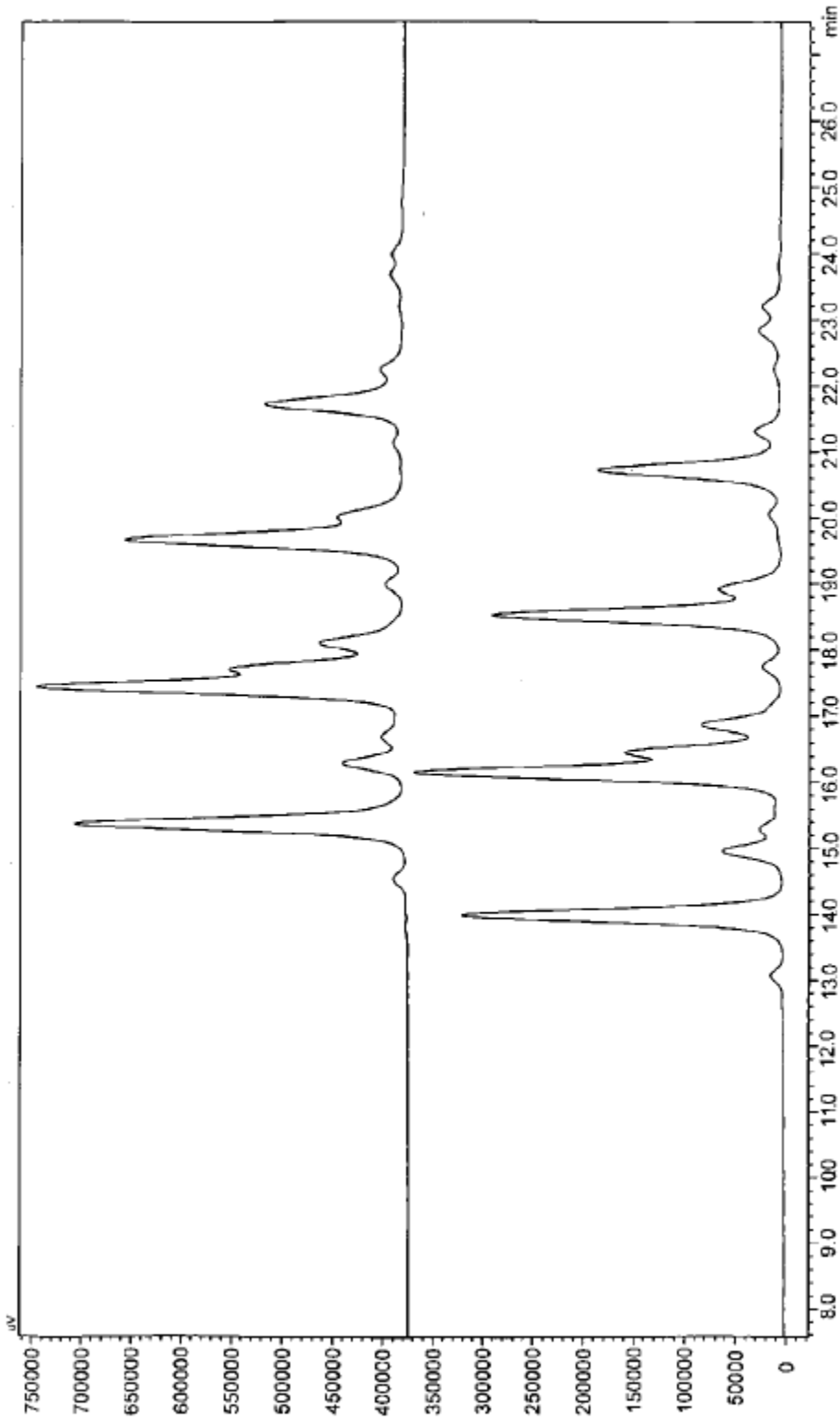


FIG. 8