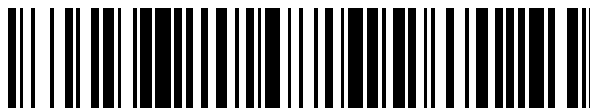


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 050**

21 Número de solicitud: 201700290

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**C09K 11/07** (2006.01)

**C07C 233/65** (2006.01)

**C07C 233/81** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**22.03.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.09.2018**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)  
Ofician de Transferencia de Resultados de  
Investigación (OTRI). Vicerrectorado de  
Transferencia, Emprendimiento y Empleo.  
Campus Universitario de Espinardo. Edificio  
Rector Soler, 1 planta  
30100 Murcia ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA CARMONA, Francisco;  
HERNÁNDEZ GARCÍA, Samanta y  
GARCÍA GARCÍA, María Inmaculada**

54 Título: **Nuevos compuestos fluorescentes con afinidad a moléculas biológicas**

57 Resumen:

Síntesis de derivados fluorescentes con aplicaciones en marcaje de proteínas, células y ácidos nucleicos. La presente invención detalla la síntesis de compuestos fluorescentes con capacidad de unión a moléculas biológicas: proteínas, ácidos nucleicos o células y sus aplicaciones en marcaje de proteínas, unión a ácidos nucleicos o señalización celular. En la presente propuesta se han sintetizado reactivos derivados del anhídrido n-metilisatoico con afinidad a moléculas biológicas, que mantienen la propiedad de ser fluorescentes. Los reactivos sintetizados presentan dos partes; una parte es el fluoróforo del anhídrido n-metilisatoico y la otra es un compuesto afín a una o varias moléculas biológicas. Estos reactivos son útiles para estudios en bioquímica, biología molecular, fisiología, microbiología o medicina. Y aplicables en técnicas tan diferentes como: citometría, localización celular, marcaje de proteínas general y marcajes específicos por zonas de reconocimiento, electroforesis 1D o 2D, microscopia, medidas de anisotropía, trasfección de ADN o cuantificación de proteínas.

ES 2 683 050 A1

## DESCRIPCIÓN

Nuevos compuestos fluorescentes con afinidad a moléculas biológicas.

### 5 Objeto de la invención

La presente invención detalla la síntesis de compuestos fluorescentes con capacidad de unión a moléculas biológicas: proteínas, ácidos nucleicos o células y sus aplicaciones en marcaje de proteínas, unión a ácidos nucleicos o señalización celular.

10 El anhídrido n-metilisatoico es un compuesto muy usado en química de heterociclos, debido a su alta reactividad y su mecanismo de reacción. Además este compuesto presenta fluorescencia, es decir el compuesto emite luz azul cuando se irradia con luz ultravioleta. En la presente propuesta se han sintetizado reactivos derivados del anhídrido n-metilisatoico con afinidad a moléculas biológicas, que mantienen la propiedad de ser fluorescentes.

Los reactivos sintetizados presentan dos partes; una parte es el fluoroforo del anhídrido n-metilisatoico y la otra es un compuesto afín a una o varias moléculas biológicas, como por ejemplo:

- 20
- 1) Colas hidrofóbicas que tienen afinidad por membranas lipídicas o por partes hidrofóbicas de las proteínas.
  - 2) Estructuras químicas con afinidad específica a zonas de reconocimiento de proteínas recombinantes como por ejemplo los complejos de níquel que tiene afinidad por la etiqueta de colas de polihistidina.
  - 25 3) Poliamidas que son capaces de unirse a ácidos nucleicos y de introducirlos en membranas celulares (reactivos de transfección).

Estos reactivos se han aplicado a marcaje y detección de proteínas en sistemas líquidos y en sistemas de electroforesis, a la unión de ácidos nucleicos o al marcaje de células para su detección por microscopía.

Los reactivos sintetizados son útiles para estudios en bioquímica, biología molecular, fisiología, microbiología o medicina. Y aplicables en técnicas tan diferentes como: citometría, localización celular, marcaje de proteínas general y marcajes específicos por zonas de reconocimiento, electroforesis 1D o 2D, microscopía, medidas de anisotropía, transfección de ADN o cuantificación de proteínas.

### 40 Sector de la técnica

Esta invención se encuadra en el ámbito de la química, en concreto en el campo de los reactivos para el marcaje fluorescente por afinidad de biomoléculas, células o tejidos.

### 45 Antecedentes de la invención y estado de la técnica

El marcaje de biomoléculas, células o tejidos es una técnica básica en las áreas de genómica, proteómica o microbiología entre otras, se emplea para la detección y estudio de las mismas. De todas las técnicas disponibles la fluorescencia y los marcajes de afinidad destacan por su utilidad, sencillez, aplicaciones biotecnológicas e impacto comercial.

50 El marcaje fluorescente es clave para la detección de biomoléculas, células o tejidos (Patton, W. F. (2000). A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. Electrophoresis, 21(6), 1123-1144.) Debido a sus propiedades: alta sensibilidad, amplio rango de detección, y versatilidad.

5 El empleo de técnicas fluorescentes mejora la sensibilidad de los sistemas de detección, como la electroforesis 1D y 2D, microscopia o citometría de flujo. No obstante el uso de técnicas fluorescentes no se emplea de rutina en los laboratorios y está limitado a ensayos muy específicos debido al alto precio de los reactivos fluorescentes empleados (Sypro Ruby, Atto 488, TAMRA). El precio de los fluoróforos sintetizados con el anhídrido n-metilisatoico es muy económico, ya que los reactivos empleados tienen un precio muy asequible, haciendo posible el empleo de los compuestos sintetizados en ensayos de rutina. Además al tener una longitud de onda de excitación de 275-315 nm es posible visualizar las proteínas marcadas en geles de acrilamida empleando simplemente una lámpara de ultravioleta en una sala oscura.

10 El marcaje fluorescente se realiza usando moléculas denominadas fluoróforos, son moléculas que tienen la capacidad de emitir luz cuando se irradian. En el mercado existen gran cantidad de moléculas fluorescentes, como la fluoresceína (Bayer, A. (1871).

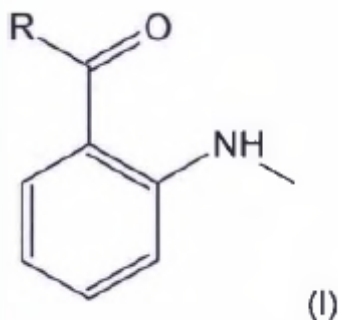
15 "Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen". Ber. Dtsch. Chem. Ges. 4, 555-558) y sus derivados, la fluorescamina (Böhlen P., S. Stein.W. Dairman, and S. Udenfriend, Arch. Biochem. Biophys. 155, 1973, 213-220), la epicoconona (Bell, P. J. L.; Karuso, P. (2003). "Epicocconone, A Novel Fluorescent Compound from the Fungus *Epicoccum nigrum*". Journal of the American Chemical Society. 125 (31): 9304-9305, [US20060094042A1],  
20 [WO2011051225A1]), el SYPRO RUBY (Demchenko, A (2011) "Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology III: Applications in Sensing and Imaging Band 3" Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology. Springer), el verde de indocianina (Benson, R. C., & Kues, H. A. (1978). Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. Physics in medicine and biology, 23(1), 159) y sus derivados (Cy2, Cy3, Cy 5), o el cloruro de dansilo (Gray, W. R. (1967). [12] Dansyl chloride procedure. Methods in enzymology, 11, 139-151) entre otros reactivos para el marcaje de biomoléculas. En la siguiente invención se emplea como molécula fluorescente el anhídrido metilisatoico, esta molécula ha sido usada en química general por su reactividad [ES2310333, ES8604936, ES0410252], en detección de polisacáridos [CN104535754 (A)] y en reacciones enzimáticas  
30 (Hiratsuka, Toshiaki. "New fluorescent analogs of cAMP and cGMP available as substrates for cyclic nucleotide phosphodiesterase". Journal of Biological Chemistry 257.22 (1982): 13354-13358).

35 Por otro lado el empleo de técnicas de unión por afinidad a biomoléculas y células está muy extendido, que se han empleado tanto para el marcaje como para la detección, separación y purificación de biomoléculas y células. Existen muchas y muy diversas técnicas de este tipo, entre la que se destaca la unión de proteínas que expresan colas de histidina a complejos de níquel (muy usada en purificación de proteínas) (Hochuli, E., Dóbeli, H., & Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. Journal of Chromatography A, 411, 177-184), el marcaje de biotina (Diamandis, E. P., & Christopoulos, T. K. (1991). The biotin-(strept) avidin system: principles and applications in biotechnology. Clinical chemistry, 37(5), 625-636) o los marcajes de anticuerpos (Stirling, J. W. (1990). Immuno- and affinity probes for electrón microscopy: a review of labeling and preparation techniques. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 38(2), 145-157).

45 La combinación de estas dos técnicas da como resultado un marcaje de afinidad que puede ser detectado mediante técnicas de instrumentación basadas en fluorescencia. Lo que mejora enormemente la sensibilidad del sistema. Este tipo de marcajes están disponibles comercialmente y aunque son muy útiles y mucho más sensibles que las técnicas de detección  
50 convencionales, su uso está limitado por su alto precio.

## Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I), que se caracterizan por tener una parte fluorescente y una parte, denominada como R, con afinidad por moléculas biológicas (proteínas, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos entre otros), tejidos y células. Este tipo de compuestos constituyen una alternativa a las derivatizaciones químicas empleadas en proteómica y genómica para introducir marcadores en biomoléculas.



Un aspecto de la invención es que la parte fluorescente del compuesto, a partir de ahora denominada fluoroforo, la forma el anhídrido n-metilisatoico. El anhídrido n-metilisatoico es un compuesto muy usado en química de heterociclos, debido a su alta reactividad y su mecanismo de reacción. Es capaz de reaccionar con aminas primarias, tioles o alcoholes en diferentes condiciones de temperatura y pH. Además de su módico precio, tiene buenas propiedades fluorescentes, rendimiento cuántico de 0.6, largo desplazamiento de Stokes (90-150 nm). El compuesto absorbe luz ultravioleta (200-300 nm) y emite luz azul (400 nm), lo que permite que pueda ser detectado con equipos comerciales.

En la presente invención se define “fluoroforo” como aquella molécula capaz de emitir luz cuando es irradiada, que pueda ser detectada con técnicas instrumentales como fluorimetría, espectroscopia, microscopía (tanto fluorescente como confocal) y sistemas de análisis de imagen.

El segundo aspecto de la invención es el compuesto que se va a hacer reaccionar con el fluoroforo para preparar el reactivo de marcaje. Este compuesto debe ser capaz de interaccionar con una o más moléculas biológicas y debe de cumplir los siguientes requisitos:

- a) que tenga al menos un grupo reactivo (amina, tiol, alcohol) para reaccionar con el fluoroforo.
- b) que ese grupo reactivo no intervenga en la posterior interacción.
- c) que el compuesto no reduzca ni interfiera en las capacidades fluorescentes del fluoroforo.
- d) que el compuesto tenga interés en los campos de biología molecular y celular, bioquímica, microbiología o medicina.

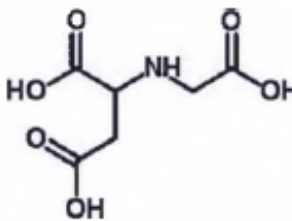
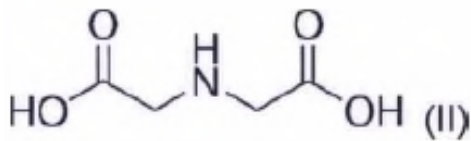
En la presente invención se define “reactivo capaz de interaccionar con moléculas biológicas, células completas o tejidos” como todo aquel reactivo que sea capaz de unirse a una molécula biológica o específicamente a una parte característica de la molécula biológica o de la célula (núcleo, membrana, orgánulos).

En la presente invención se define “molécula biológica”, como toda aquella molécula presente en organismos vivos (animales, vegetales, hongos, bacterias), más específicamente proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos.

En la presente invención se denominan como "células" tanto a células eucariotas como procariontas.

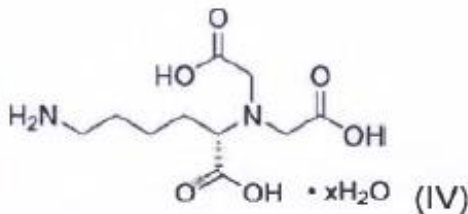
5 Preferentemente los compuestos capaces de interactuar con moléculas biológicas que cumplan los requisitos nombrados son:

10 a) Compuestos capaces de quelatar metales, como son el ácido iminodiacético de fórmula general (II), carboximetil aspartato de fórmula general (III) o la bis carboximetil lisina de fórmula general (IV) entre otros, estos compuestos quelatados con metales como Ni<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup> o Co<sup>+2</sup> entre otros, son capaces de unirse con mucha selectividad a proteínas que expresan colas de histidina.



(III)

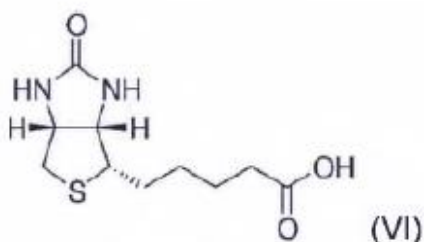
15



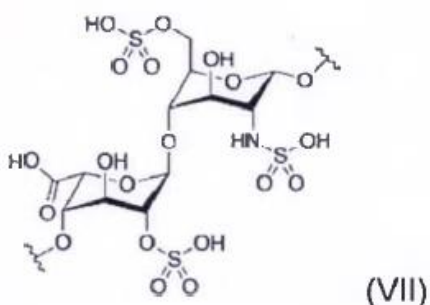
20 b) Cadenas hidrofóbicas, son cadenas formadas por dos o más metilos unidos (cadenas alquílicas) que tienen fórmula general (V), siendo R un alcohol, un ácido o una amina, más específicamente una amina, presentan hidrofobicidad. Las cadenas hidrofóbicas tienen afinidad por membranas lipídicas o surfactantes como el SDS.

25 CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R (V)

c) La biotina, de fórmula general (VI) y sus derivados es un marcador específico de proteínas como la estreptavidina o la avidina.



- 5 d) La heparina, de fórmula general (VII) y sus derivados es un disacárido con mucha afinidad por trombina, una proteína presente en la sangre y responsable de la coagulación de la misma. Heparina también tiene afinidad por fibronectina. También se sobre-expresan proteínas con colas de trombina como marcador específico.



- 10 e) Anticuerpos contra FLAG-tag, HA-tag, Myc-tag entre otros.
- f) Inhibidores de enzimas, con interés médico o farmacológico como los inhibidores de caspasa, entre otros.
- 15 g) Poliamidas que tienen mucha afinidad por ácidos nucleicos.
- h) Poli etilenglicoles que tienen afinidad por proteínas y por ácidos nucleicos.

Otro aspecto de la invención es la aplicación de estos compuestos fluorescentes para detección de moléculas biológicas, células o tejidos. Como son la detección de proteínas específicas una vez electroeluidas en geles de agarosa o acrilamida, preferentemente geles de acrilamida, la detección en medio líquido proteínas usando fluorescencia o medidas de anisotropía fluorescente o el marcaje y detección de células mediante microscopía fluorescente o confocal, preferentemente microscopía confocal. Aplicables en campos tan diversos como bioquímica, microbiológica, biología molecular y celular, analítica o medicina.

25

### Breve descripción del contenido de las figuras

- 30 – FIG. 1. Esquema de síntesis de un reactivo fluorescente de afinidad (MI-NTANi+2) a proteínas que expresan colas de histidina.
- FIG 2. Gel de electroforesis de proteínas HIS-tag marcado con el reactivo fluorescente MI-NTANi+2.
- 35 – FIG. 3. Esquema de síntesis de un reactivo fluorescente hidrofóbico (MI-C18).

- FIG. 4: Gel de electroforesis de proteínas (BSA y lisozima), teñido con el reactivo fluorescente sintetizado MI-C18.
- 5 – FIG. 5. Método de valoración de proteínas en medio líquido, la placa de 96 pocillos contiene y diferentes concentraciones de BSA (0-1 mg/mL).
- FIG. 6. Esquema de marcaje de membranas lipídicas con el reactivo hidrofóbico MI- C18.
- 10 – FIG. 7. Microscopia confocal de un *Bacillus subtilis* marcado con el reactivo hidrofóbico preparado MI-C18.

### Descripción de un modo de realización preferente de la invención

15 Ejemplo 1: Síntesis de un reactivo fluorescente para la detección de proteínas HIS-tag (MI-NTA).

20 Para sintetizar MI-NTA, se disolvieron 13.1 mg de  $\text{N}\alpha$ ,  $\text{N}\alpha$ -Bis (carboximetil) -L-lisina en 50 mL de tampón de fosfato (20 mM, pH 8.7), siendo la concentración final en la disolución 1 mM. A continuación se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de anhídrido n-metilisatoico (100 mM) disueltos en DMSO, siendo la concentración final 1 mM. La solución se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. El níquel se cargó añadiendo 12 mg de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  a 50 mL del MI-NTA para preparar MI-NTANi<sup>2+</sup>. La figura 1 muestra el esquema de reacción y el posterior marcaje de afinidad.

25 Ejemplo 2: Aplicación del reactivo sintetizado en el ejemplo 1 a la detección de proteínas HIS-tag en geles de acrilamida.

30 Los geles de SDS se prepararon con acrilamida / bisacrilamida al 12% siguiendo el procedimiento normal (Laemmli 1970), las muestras se desnaturalizaron en tampón Laemmli a 100 °C durante 5 minutos. Se cargaron diferentes volúmenes de la muestra (2.5-25  $\mu\text{L}$ ) en el gel.

35 Los geles se lavaron dos veces con agua desionizada, se fijaron 30 minutos con una disolución de fijación (etanol al 40%, ácido acético al 10%) y se tiñeron con 50 mL de 100  $\mu\text{M}$  del reactivo preparado en el ejemplo 1 diluido en Tris / HCl 10 mM, pH 8.4. Los geles se dejaron teñir durante 12 horas a temperatura ambiente. Después se desechó la tinción y los geles se lavaron dos veces con 50 ml de disolución de lavado (etanol al 40%, ácido acético al 10%). Los geles se visualizaron directamente en una habitación oscura con una lámpara UV de 315 nm, se obtuvieron imágenes de los geles con el equipo Al 600 usando EPI fluorescencia con dos canales de excitación, azul y verde para obtener imágenes en color. La figura 2 muestra un gel en el que se han marcado solo proteínas que expresan HIS-tag con el reactivo preparado en el ejemplo 1. Con este reactivo se puede detectar hasta 50 ng de proteína HIS-tag.

45 Ejemplo 3: Preparación de un reactivo fluorescente hidrofóbico MI-C18.

50 Para sintetizar el reactivo hidrofóbico fluorescente MI-C18, se disolvieron 134,7 mg de octadecilamina en 50 mL de acetona (TEA al 1 %/ácido acético pH 10.0), siendo la concentración final de octadecilamina en la solución 10 mM. A continuación se añadieron 5 ml de anhídrido n-metilisatoico (100 mM) disueltos en DMSO, siendo la concentración final 10 mM. La solución se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La figura 3 muestra el esquema de reacción.

Ejemplo 4: Teñido de geles de acrilamida con el reactivo hidrofóbico MI-C18 sintetizado en el ejemplo 3.

5 Los geles de acrilamida se cargaron con diferentes volúmenes (2-20  $\mu$ l) de una disolución de BSA y lisozima (5 mg/mL de proteína) diluidos en tampón de carga Laemmli. La tinción del gel se realizó en una disolución 40% etanol y 10% ácido acético usando 0,1 mM del reactivo sintetizado en el ejemplo 3. Los geles se dejaron teñir 45 minutos bajo agitación orbital, luego se lavaron dos veces con agua durante 5 minutos y se almacenaron en una disolución de ácido acético al 5%, etanol al 10%, SDS al 2%. La figura 4 muestra la imagen del gel obtenido, usando fluorescencia UV y EPI fluorescencia.

Ejemplo 5: Método de valoración de proteínas en medio líquido empleando el reactivo hidrofóbico MI-C18.

15 Se propone un método de valoración de proteínas en medio líquido empleando el reactivo sintetizado en el ejemplo 3. La recta de calibrado se prepara con ácido acético al 1.5%, SDS al 0.1%, el reactivo preparado en el ejemplo 3 MI-C18 1.6  $\mu$ M y BSA (0.05 - 1 mg / mL). Los reactivos se mezclaron en una cubeta espectrofotométrica de 3 ml y la fluorescencia se midió con una longitud de onda de excitación de 350 nm y la longitud de onda de emisión a 430 nm. La figura 5 muestra la placa de 96 pocillos que se usó para preparar la recta de calibrado. Los resultados muestran que el método es lineal entre 0.015 to 1 mg/mL.

Ejemplo 6: Método de marcaje de células empleando el reactivo hidrofóbico del ejemplo 3 MI-C18.

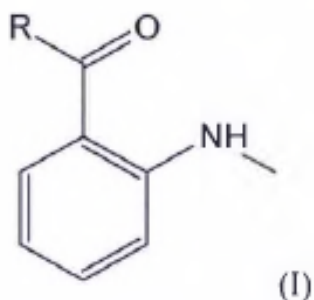
25 La cepa bacteriana de *Bacillus subtilis* se cultivó en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) a 30 °C durante 3-6 horas. Las células se centrifugaron a 7000 rpm a 4 °C durante diez minutos, después se desechó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 5 ml de solución salina estéril (NaCl al 0.85%). Para la tinción se mezclaron 1 mL de bacterias en solución salina con 5  $\mu$ M del reactivo preparado en el ejemplo 3. Las muestras se incubaron en frío (4 °C) durante 12 horas, luego se centrifugaron y el pellet de células se lavó con solución salina tres veces. Las muestras se almacenaron en solución salina a 4 °C.

35 Se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos de microscopio y se cubrió con un cubreobjetos. Se tomaron imágenes de fluorescencia de las muestras usando un microscopia confocal espectral invertido Leica TCS-SP2 equipado con AOBS, un módulo confocal D-eclipse C1 y una cámara refrigerada DXM 1200C. Las muestras teñidas fueron excitadas usando el diodo azul (408 nm). La figura 6 muestra esquematiza el procedimiento de tinción de membranas lipídicas con el reactivo del ejemplo 3. La figura 7 muestra la imagen de microscopia confocal de un *Bacillus* teñido con el reactivo preparado en el ejemplo 3, MI-C18.



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Compuestos fluorescentes derivados del anhídrido n-metilisatoico de fórmula general (I), para el mareaje, detección, cuantificación, localización o señalización de moléculas biológicas, tejidos y células.



- 10 Donde R es un compuesto con afinidad por moléculas biológicas, células o tejidos.
- 15 2. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es un complejo metálico con afinidad por colas de histidina, siendo el compuesto resultante fluorescente y manteniendo la afinidad por las histidinas.
- 20 3. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es una cadena alquilada con afinidad por biomoléculas hidrofóbicas o zonas hidrofóbicas de proteínas, siendo el compuesto resultante fluorescente y manteniendo su hidrofobicidad.
- 25 4. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es la biotina o uno de sus derivados, siendo el compuesto resultante fluorescente y manteniendo la afinidad por estreptavidina y sus derivados.
- 30 5. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es la heparina o uno de sus derivados, siendo el compuesto resultante fluorescente y manteniendo la afinidad trombina.
- 35 6. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es un anticuerpo.
- 40 7. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es un inhibidor enzimático.
8. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es una poliamina.
9. Compuestos según reivindicación 1, donde el compuesto con afinidad biológica es un polietilenglicol.
10. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 2-9, para el mareaje de moléculas biológicas.
11. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 2-9, para la detección de proteínas en geles de acrilamida o agarosa.

12. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 2-9, para la detección de proteínas y otras moléculas biológicas en medio líquido.
- 5 13. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 2-9, para marcaje, localización y señalización de células y microorganismos.
14. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 8-9, para la detección de ácidos nucleicos en geles de acrilamida o agarosa.
- 10 15. Uso de los compuestos de las reivindicaciones 8-9, para marcaje, localización señalización y transfección de ácidos nucleicos.

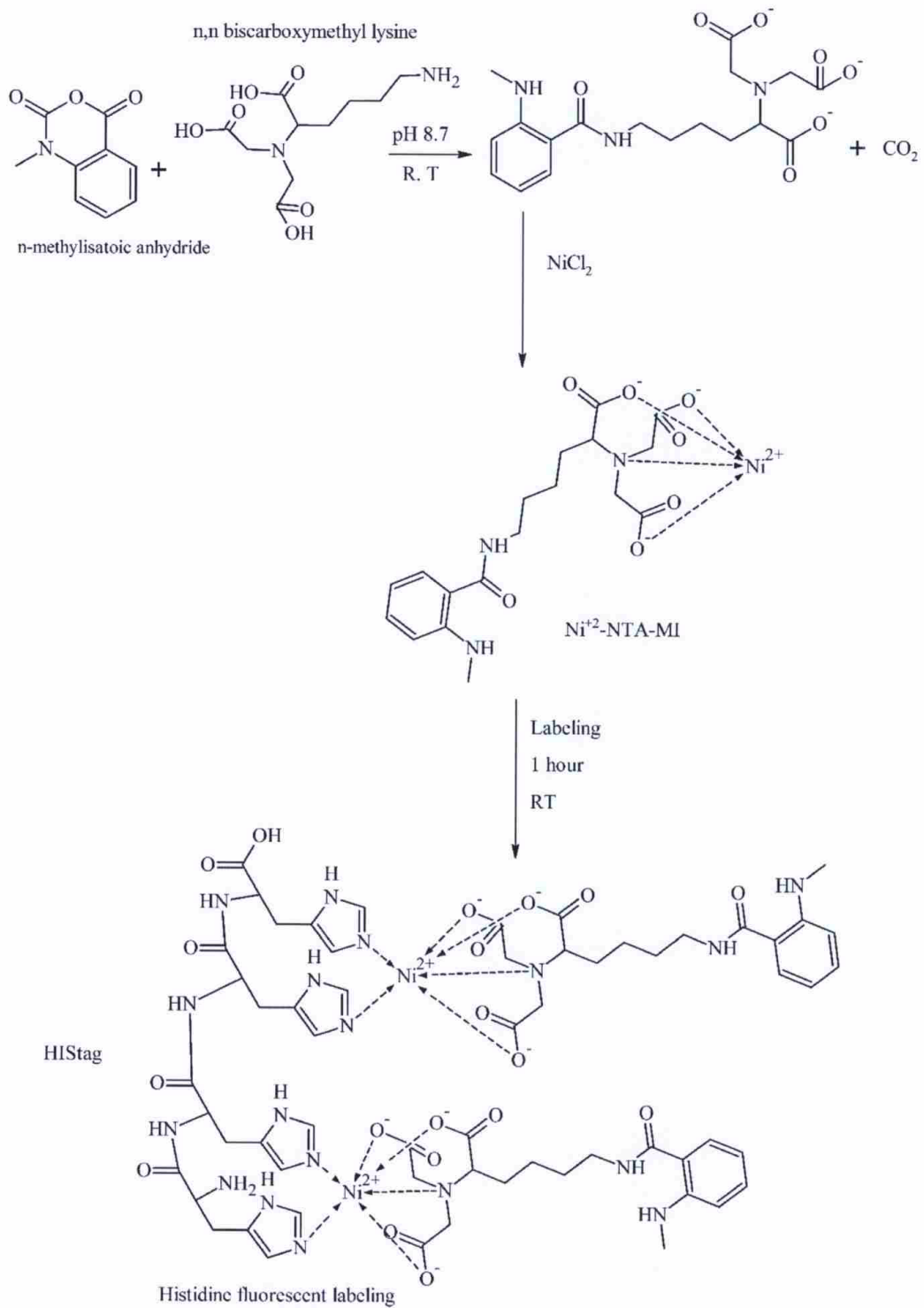


Figura 1

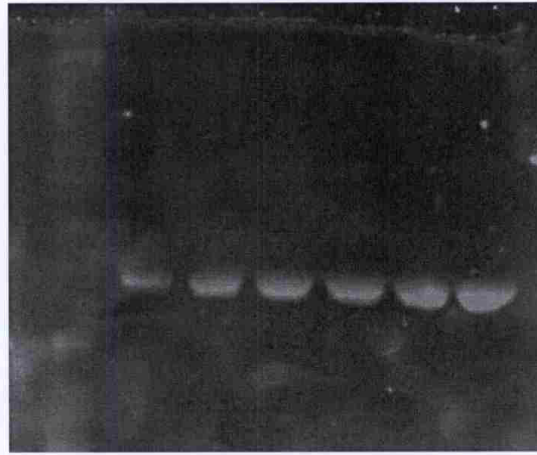


Figura 2

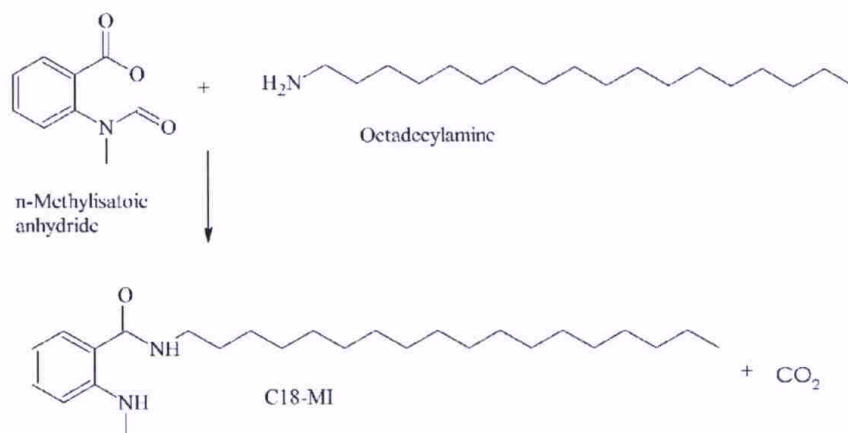


Figura 3

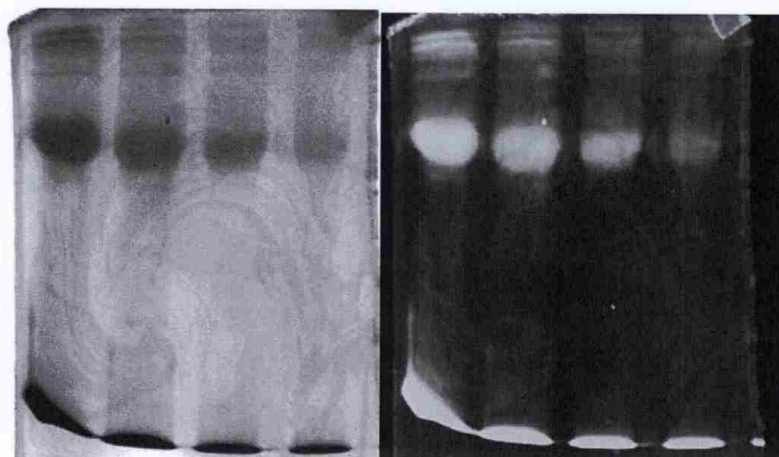


Figura 4

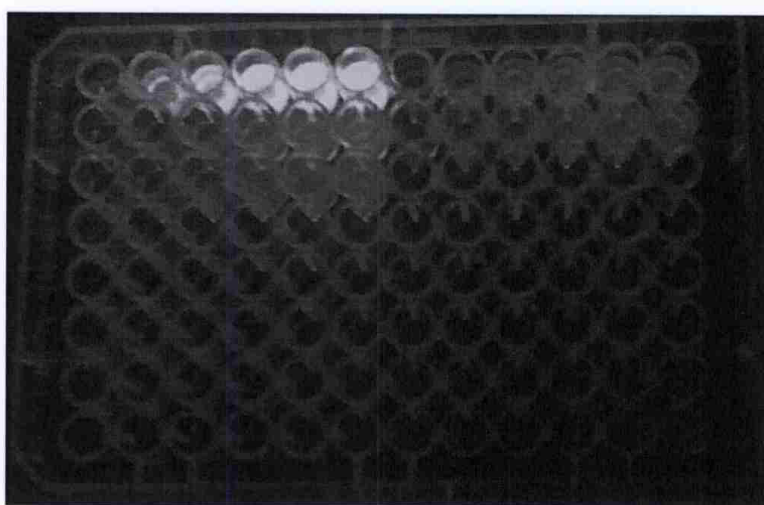


Figura 5

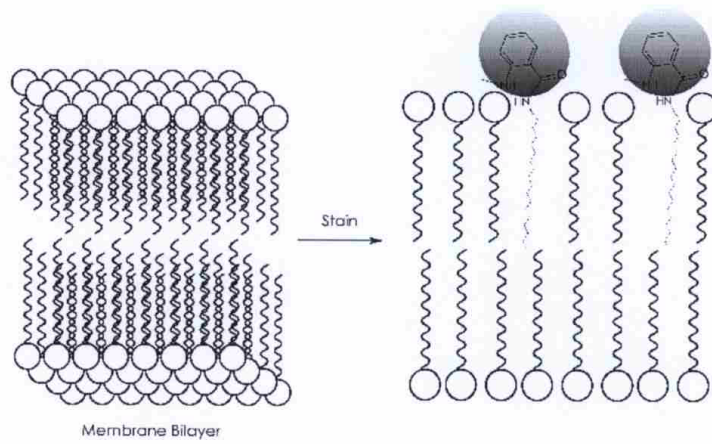


Figura 6

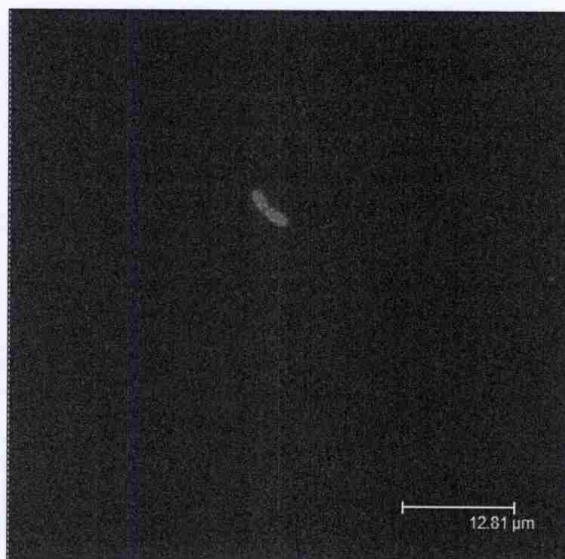


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201700290

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 22.03.2017

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2016/038205 A1 (UNIVERSITE DE LORRAINE Y INSERM) 17/03/2016, reivindicaciones, ejemplo 1	1-15
A	CN 104535754 A (NANCHANG UNIVERSITY) 22/04/2015, resumen en inglés en la base de datos ESPACENET (European Patent Office)	1-15
A	I M SHARMA et al., SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A FLUORESCENT ANALOGUE OF CYCLIC DI-GMP, Biochemistry 2012, Vol. 51, Páginas 5443-5453, resumen	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
16.06.2017

Examinador  
M. Fernández Fernández

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N21/64** (2006.01)

**G01N33/52** (2006.01)

**C09K11/07** (2006.01)

**C07C233/65** (2006.01)

**C07C233/81** (2006.01)

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

C07C, C09K, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, ESPACENET, CAS, BIOSIS



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.06.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2016/038205 A1 (UNIVERSITE DE LORRAINE Y INSERM)	17.03.2016
D02	CN 104535754 A (NANCHANG UNIVERSITY)	22.04.2015
D03	I M SHARMA et al. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF A FLUORESCENT ANALOGUE OF CYCLIC DI-GMP. Biochemistry Vol.51, Páginas 5443-5453	2012

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere (reivindicación 1) a compuestos fluorescentes derivados del anhídrido N-metilisatoico con afinidad a moléculas biológicas, de fórmula (I). El compuesto con afinidad biológica, reivindicaciones 2-9, puede ser histidinas, zonas hidrofóbicas de proteínas, biotina, heparina, un anticuerpo, un inhibidor enzimático, una poliamina o un polietilenglicol. Las reivindicaciones 10-15 se refieren al uso de estos compuestos para el marcaje de moléculas biológicas y células y detección de proteínas y ácidos nucleicos.

El documento D1, ver resumen y reivindicaciones, divulga conjugados fluorescentes de anhídrido N-metilisatoico con carbohidratos (mono, oligo o polisacáridos), se usan en particular para estudiar las interacciones proteína-azúcar.

El documento D2 divulga también, ver resumen, compuestos fluorescentes de anhídrido N-metilisatoico con polisacáridos, se detectan los polisacáridos marcados con un detector de fluorescencia.

El documento D3 divulga un conjugado fluorescente de anhídrido N-metilisatoico con di-GMP cíclico para detección de c-di-GMP.

Si bien la fórmula (I) de la solicitud es similar a las fórmulas de D1 y D3 puesto que se utiliza el mismo reactivo fluorescente, no se incluyen en la solicitud los posibles sustituyentes (carbohidratos o GMP) del estado de la técnica, por lo que se concluye la novedad de la invención de la solicitud; respecto a la actividad inventiva se considera que no es obvio para un técnico en la materia que compuestos fluorescentes del anhídrido N-metilisatoico conjugados con otras moléculas puedan resultar útiles para la detección y marcaje de proteínas y ácidos nucleicos, según las reivindicaciones 10-15 de la solicitud, sin confirmar experimentalmente su comportamiento ya que se trata de complejos muy distintos a los divulgados.

En conclusión se considera que las reivindicaciones 1-15 de la solicitud cumplen lo establecido en los Art 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.