

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 233**

51 Int. Cl.:

G01N 33/82 (2006.01)

C07D 475/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/FR2013/053271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13821895 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2939029**

54 Título: **Derivados de folato, particularmente útiles en el marco de la dosificación de folatos(s)**

30 Prioridad:

27.12.2012 FR 1262898

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

21.02.2019

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy-l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**GUO, YUPING y
CHEUCLE, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 701 233 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de folato, particularmente útiles en el marco de la dosificación de folatos(s)

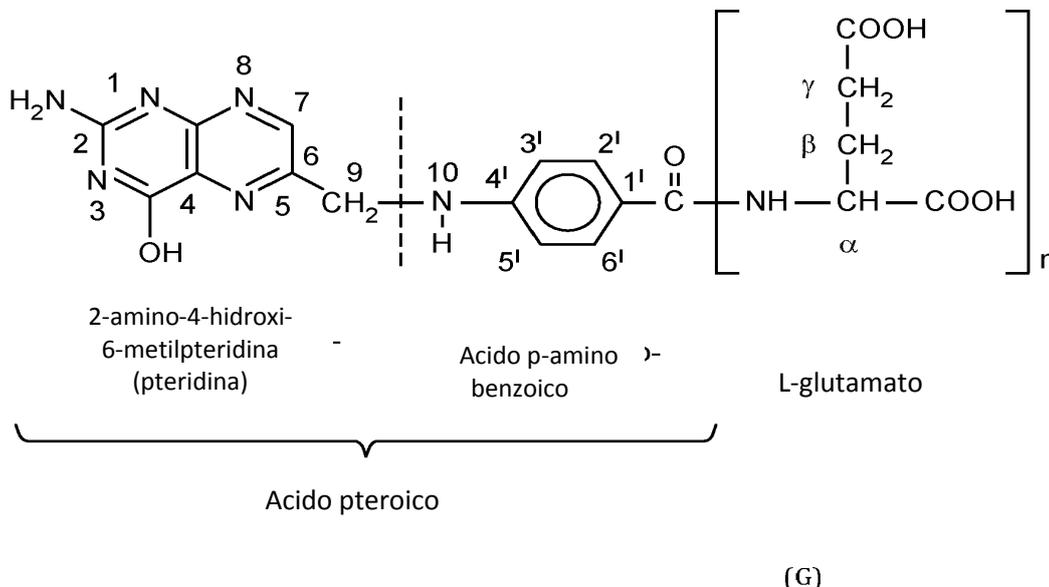
Dominio de la técnica

5 La presente invención se refiere a derivados de folatos, especialmente útiles para dosificar uno/ varios folato(s) en una muestra biológica, *in vitro*, de preferencia utilizando técnicas de inmunodosificación por competición no radioisotópica.

Estado de la técnica

10 La vitamina B9 es la denominación genérica dada a una familia de compuestos química y biológicamente muy próximos, que se derivan todos del ácido fólico. Una de las características principales de estos compuestos es que su presencia en cantidad insuficiente, incluso su ausencia, provoca una anemia en el hombre o el animal. La familia de los folatos comprende, entre otros, la vitamina M, la vitamina Bc, la folacina y el ácido fólico. En el sentido de la presente solicitud, cada uno de los compuestos que pertenecen a esta familia se denomina « folato », varios miembros de esta familia se designan por lo tanto « folatos », mientras que la mezcla de los constituyentes de la familia de la vitamina B9 se denomina « folato total ».

15 Como esto es bien conocido por el experto en la materia, el ácido fólico, denominado también ácido pteroilmonoglutámico, está formado por un grupo pterina, un grupo p-aminobenzoico y un grupo glutamato como el representado a continuación en la fórmula general (G):



en la que n es el número entero 1.

20 Como se representa en esta fórmula general, el ácido fólico posee dos funciones ácido carboxílico en su parte glutamato, una en posición α , la otra en posición γ .

25 En la alimentación, los folatos se encuentran mayoritariamente en forma de metil o formil glutamatos reducidos. Durante la digestión, estos poliglutamatos se transforman en monoglutamatos, activamente absorbidos por los enterocitos. A continuación los monoglutamatos se transforman en 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), forma en la que los folatos atraviesan la barrera intestinal y llegan a la circulación sistémica.

30 En la sangre, la mayor parte de los folatos circulantes se liga con una débil afinidad a diversas proteínas: la α -macroglobulina (40%), la albumina (33%) y la transferrina (23%). Las concentraciones plasmáticas de vitamina B9 varían entre 5 a 15 $\mu\text{g/L}$ y están fuertemente impactadas por los aportes alimentarios. La concentración de vitamina B9 es aproximadamente 20 veces más elevada en los hematíes que pueden contener hasta 95% de los folatos circulantes. Múltiples formas de folatos se presentan en el suero humano, pero la forma circulante e intracelular preponderante es el 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), que es también la forma de almacenamiento hepático. De manera general, los compuestos biológicamente activos son únicamente las formas reducidas: el derivado dihydrofolato (DHF), y sobre todo el tetrahydrofolato (THF) así como sus derivados metilados y formilados. Tal como se indicó anteriormente, en el sentido de la presente invención, la denominación « folatos » cubre especialmente estas formas reducidas ; denominándose folato cada una de estas formas, tomadas por separado.

Las células eucariotas, así como ciertas formas procariotas son incapaces de sintetizar el ácido fólico. Ellas utilizan por lo tanto sistemas de transporte transmembránicos que permiten internalizar la molécula exógena. Actualmente, se han descrito dos principales sistemas de transporte. Sin embargo, probablemente existen también vías secundarias como la difusión pasiva. Los folatos oxidados como el ácido fólico son transportados al interior de las células por los receptores de folatos (FR), « folate receptors » en lengua inglesa (Antony, 1992 [1]). Estas proteínas antiguamente denominadas « folate binding proteins » (FBPs). En el hombre se identificaron tres isoformas, denominadas respectivamente FR α (P15328), PR β (P14207) y FR γ (P41439), correspondiendo el código indicado entre paréntesis al identificador de la proteína en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>). Las FR α y β están ancladas en la membrana plasmática por una parte lipídica, el glicosilfosfatidilinositol (GPI). La isoforma γ es secretada. En cuanto a los folatos reducidos, son transportados por una proteína denominada transportadora de folatos reducidos (P41440) o « reduced folate carrier » en lengua inglesa (RFC). Se trata de una proteína membranar integral fuertemente glicosilada que posee varios dominios transmembranales.

En cuanto a su estructura química, los folatos juegan un rol esencial en la síntesis y el metabolismo de los constituyentes de base de nuestro organismo, a saber los aminoácidos y las bases (purinas y pirimidinas).

El THF, coenzima esencial, es capaz de fijar y de ceder radicales a un átomo de carbono. Está implicado en la síntesis de la glicina y el catabolismo de la histidina.

El 5-MTHF permite la remetilación de la homocisteína en metionina por vía de la metilcobalamina y la metionina sintetasa. Los folatos intervienen también en varias etapas clave de las biosíntesis de las purinas y de las pirimidinas, condicionando así la síntesis de los ácidos nucleicos ADN y ARN. A causa de este rol central, una carencia de folato(s) tiene graves consecuencias y numerosas manifestaciones fisiopatológicas.

La carencia profunda de folatos da lugar a señales generales, hematológicas y neuropsiquiátricas. Lentamente, aparecen una astenia y una anorexia. La anemia puede ir precedida por una macrocitosis aislada. Esta anemia, frecuentemente de tipo megaloblástico, es una de las manifestaciones más frecuente de la carencia de folatos. Además, existe frecuentemente una carencia combinada de folatos y hierro que se traduce, en lugar de la clásica anemia macrocitaria, en una anemia normocitaria con una presencia de cuerpos de Jolly sobre el frotis. Esta anemia se debe al hecho de que las purinas y pirimidinas no están disponibles en cantidad suficiente, resultando así la imposibilidad de las células madre sanguíneas de sintetizar material genético y, por lo tanto, de dividirse. Por el contrario, las células existentes continúan creciendo, lo que explica en parte el tipo generalmente megaloblástico de la anemia ligada a una carencia de folatos.

Los folatos son igualmente necesarios para el buen funcionamiento del cerebro y contribuyen a la salud mental y el equilibrio emocional. Así, una carencia de vitamina B9 induce trastornos neuropsiquiátricos. Estos trastornos podrían estar ligados en parte a anomalías en la síntesis de ciertas aminos y de la glicina. Esta última es también un neurotransmisor.

Por su contribución en la síntesis del material genético, un aporte satisfactorio de folatos es particularmente necesario durante la infancia, la adolescencia y el embarazo. En efecto, en los niños que tienen carencia de folatos se puede encontrar frecuentemente un retraso en el desarrollo psicomotor y una hipotrofia estatura-ponderal. Durante el embarazo, una carencia de folatos puede inducir un retraso o anomalías en el desarrollo del feto, incluso malformaciones congénitas como la espina bifida que es un cierre incompleto del tubo neural, o también la trisomía.

La carencia de folatos se asocia igualmente a un riesgo incrementado de enfermedades cardiovasculares, más precisamente de trombosis arteriales y/o venosas y de arteriosclerosis. El riesgo está ligado a la tasa plasmática de homocisteína, resultante del defecto de metilación de este compuesto de metionina.

Esta lista no es limitativa y la carencia de folatos es susceptible de inducir otras afecciones/patologías. Por lo tanto, es primordial poder dosificar todo o parte de los folatos en el individuo humano o animal, preferentemente el folato « total », a saber constituido por la mezcla de las diferentes formas de folatos.

Además, es igualmente importante poder cuantificar todo o parte de los folatos presentes en el seno de muestras de origen alimentario (destinados a la alimentación humana o animal) con el fin de verificar el aporte de vitamina B9 de los alimentos de interés. Puede igualmente ser interesante el dosificar los folatos en los productos de tipo complementos alimentarios, con el fin de asegurar que estos últimos contienen una cantidad/concentración suficiente de folato(s). Estos complementos alimentarios pueden servir para prevenir eventuales carencias de vitamina B9.

Desde el punto de vista clínico, la dosificación de los folatos en la sangre entera, el suero, el plasma o en los eritrocitos presenta un cierto interés. La disminución de la concentración sanguínea de folatos se traduce potencialmente en una carencia que conviene explorar a nivel clínico asociándolo eventualmente a otras dosificaciones vitamínicas o de metabolitos. La tasa sanguínea de los folatos está sometida a variaciones en función del régimen alimentario o a la ingesta de medicamentos. La tasa de los folatos eritrocitarios es la que representa la mejor estimación de las reservas de folatos del organismo.

Existen varios métodos que permiten la cuantificación plasmática, sérica y/o eritrocitaria de los folatos en las muestras biológicas de origen clínico, a saber procedentes de los pacientes. Estos métodos se pueden clasificar en tres grupos principales, a saber: (1) las técnicas microbiológicas, (2) las técnicas cromatográficas y (3) las inmunodosificaciones por competición.

5 Las técnicas microbiológicas (1) utilizan generalmente un germen « folatos-dependiente », cuyo crecimiento es proporcional a la tasa de vitamina presente en la muestra a dosificar. En general, las muestras se desproteinizan a 100°C en presencia de vitamina C, que juega el rol de antioxidante. La puesta en contacto con la cepa bacteriana se realiza durante 20 horas a 37°C. El germen más frecuentemente utilizado, *Lactobacillus casei*, es sensible a todas las formas oxidadas y reducidas de folatos; otros gérmenes son sensibles a formas más específicas. Por ejemplo, *Streptococcus faecalis* permite dosificar todas las formas de folatos a excepción del 5-MTHF. La concentración de 5-MTHF, forma preponderante en el suero y en los eritrocitos, se obtiene por la diferencia entre los valores de *L. casei* y de *S. faecalis*. Un tercer germen, *Pediococcus cerevisiae* es sensible exclusivamente a N5- formil-THF (ácido folínico).

15 Estas técnicas microbiológicas (1), aunque generalmente sensibles y reproducibles, son fastidiosas y cronóforas. Además, presentan riesgos de interferencias con los antibióticos y los antimetabólicos, tales como el metotrexato, la trimetoprima y la pirimetamina.

Las dosificaciones de tipo cromatográfico (2) permiten la separación de los diferentes compuestos pertenecientes a la familia de los folatos. Como ejemplos de dosificación por cromatografía, se pueden citar especialmente:

- la dosificación por cromatografía sobre capa fina acoplada al HPLC (Reif, V. D. et al., 1977 [2]),
- la dosificación por cromatografía (generalmente en fase gaseosa o líquida) acoplada a la espectrometría de masa (MS), por ejemplo por :

20 a) cromatografía en fase gaseosa/espectrometría de masa con dilución isotópica (ID-GCMS) (Dueker, S. R. et al., 2000 [3]), o

25 b) cromatografía en fase líquida - espectrometría de masa en tandem con dilución isotópica (ID-LC-MS/MS) (Pfeiffer, C. M. et al., 2004 [4]).

Estas dosificaciones de tipo cromatográfico (2) tienen especialmente el inconveniente de necesitar la puesta a punto de ensayos muy técnicos que requieren un personal cualificado. El instrumento resulta, además, caro.

30 En vista de la problemática encontrada durante la ejecución de las técnicas microbiológicas (1) y las técnicas cromatográficas (2) (cf. más arriba), se han desarrollado las inmunodosificaciones por competición (3). A la vez que permite reducir el tiempo de análisis, estos últimos permiten (3) permitir dosificar el folato « total » y establecer un diagnóstico clínico fiable en relación a una eventual carencia de folatos.

35 Estos procedimientos de inmunodosificación (3), igualmente denominados dosificaciones inmunológicas o ensayos inmunoquímicos, implican la unión del analito a detectar - a saber el/los folato(s) - con al menos un primer compuesto que es un partícipe de unión con este analito. Como la dosificación del o de los folato(s) se hace por competición, el procedimiento implica igualmente al menos un segundo compuesto que entre en competición con el folato a dosificar frente a la fijación sobre el partícipe de unión, siendo este segundo compuesto un derivado de folato. La continuación de esta reacción implica el marcado de uno de los dos compuestos. Este compuesto marcado se denomina conjugado marcado o trazador.

40 Quede bien entendido que el prefijo « inmuno », por ejemplo en « inmunodosificación », no se va a considerar en la presente solicitud como que indica estrictamente que el partícipe de unión es un partícipe inmunológico, tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En efecto, como es bien conocido por el experto en la materia, este término se utiliza más ampliamente para designar los ensayos y procedimientos en los cuales el partícipe de unión, igualmente denominado ligando, no es un partícipe inmunológico, pero que consiste, por ejemplo, en un receptor del analito que se desea dosificar. Siendo la condición que el partícipe de unión sea capaz de unirse al analito, de preferencia de manera específica. Así, es conocido el hablar de la dosificación ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para dosificaciones que utilizan partícipes de unión no inmunológicos en sentido estricto, denominados más ampliamente en inglés « Ligand Binding Assay », que se podría traducir al francés por « Dosificación utilizando la unión a un ligando », mientras que el término « inmuno » está incluido en el acrónimo ELISA. En un afán de claridad y uniformidad, el término « inmuno » se emplea en la presente solicitud para designar cualquier dosificación utilizando un partícipe de unión adaptado para unirse al analito a cuantificar, preferentemente de manera específica, incluso cuando este partícipe de unión no es de naturaleza o de origen inmunológico en sentido estricto.

55 En el marco de las inmunodosificaciones por competición (3), y cuando se utiliza un conjugado marcado, se distinguen tres tipos de inmunodosificación por competición en función de la naturaleza del conjugado marcado y del tipo de señal emitida por dicho conjugado, a saber:

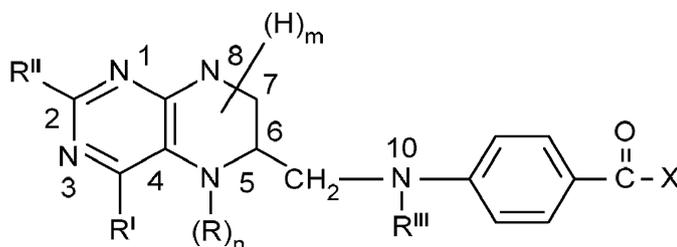
- las inmunodosificaciones radio-isotópicas (Waxman S. et Schreiber C., 1980 [5]), (Waxman S. et Schreiber C., 1980 [5])
- las dosificaciones inmuno-enzimáticas o EIA « enzyme linked immunoassay - assay » ; en función del sustrato enzimático elegido, la señal puede ser de tipo colorimétrico (Hansen, S. I. et Holm, J., 1988 [6]), de tipo fluorescente o quimioluminiscente.[6]),
- las inmunodosificaciones electroluminiscentes (Owen, W.E. et Roberts, W. L.2003 [7]).

Los dos últimos tipos de inmunodosificación por competición se denominan « inmunodosificaciones por competición no radio-isotópicas ».

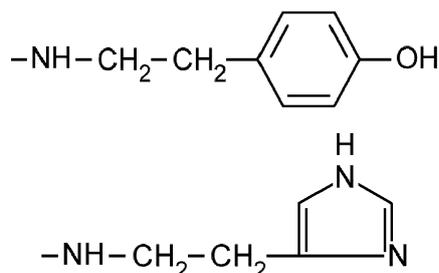
El desarrollo de los métodos radio-isotópicos (RIA), a partir de los años 1960 ha revolucionado la cuantificación de las vitaminas y especialmente de la vitamina B9.

La solicitud de patente t WO 80/00562 ilustra esto divulgando derivados radioactivos del folato, sustituidos a nivel de la función ácido carboxílico que porta el carbono α y/o el carbono γ del derivado glutamato. El marcado radioactivo procede de la inserción de yodo 125 o 130 en el seno del núcleo fenol de un motivo tirosina.

La solicitud de patente francesa FR-A-2455602 se refiere igualmente a la obtención de compuestos radio-yodados y menciona derivados del ácido pterico de fórmula general:



en la que el grupo glutamato está reemplazado por el radical X, representando este radical X, a elección, el resto de un aminoácido o de un « descarboxiaminoácido » que comprende obligatoriamente un núcleo o heterocíclico, indispensable para el marcado radio-isotópico (con yodo 125, 131 o 123). Este núcleo aromático o heterocíclico yodado se separa del grupo ácido p-aminobenzoico por una cadena que no porta más de 5 átomos de carbono, unida al grupo ácido p-aminobenzoico por una amina secundaria. Como ejemplo de « resto de descarboxiaminoácidos » que comprenden un núcleo aromático o heterocíclico, se divulgan las estructuras siguientes:



Sin embargo, estas dosificaciones radio-isotópicas (RIA) tenían especialmente como inconveniente el tratamiento de los desechos radioactivos y el periodo de semivida relativamente corto de los reactivos marcados.

Esto es por lo que las inmunodosificaciones por competición no radio-isotópica se desarrollaron en detrimento del RIA que hoy no se utiliza más que raramente.

A título ilustrativo, la publicación Arcot J. et al, 2005 [8] describe un procedimiento de dosificación del ácido fólico por unión a una proteína marcada por una enzima (« enzyme-labelled protein binding assay » en lengua inglesa), siendo dicha proteína marcada la FBP, y estando basado el procedimiento en la competición entre las moléculas de ácido fólico libres en la muestra biológica y células previamente inmovilizadas en una placa de microtitulación para fijarse sobre las FBP marcadas. Después del lavado, la etapa de revelado se efectúa introduciendo un sustrato enzimático incoloro, que induce una coloración azul después de la escisión por la enzima fijada a la FBP. Como esto es generalmente el caso en las dosificaciones por competición, la cantidad de ácido fólico libre presente en la muestra se determina en referencia a una curva de calibrado, a partir de la cual se deduce la cantidad de ácido fólico libre presente en la muestra, en función de la intensidad luminosa medida.

El kit Abbott AxSYM Folate (Cat. N°. B7K460, Abbott Laboratories) permite igualmente la utilización de un procedimiento de dosificación de folatos por competición. Este kit utiliza como partícipe de unión, la proteína FBP y,

5 como conjugado marcado, el ácido pterico (un análogo de folato) acoplado a la fosfatasa alcalina (PAL). El principio del ensayo se basa en la competición entre el ácido fólico a dosificar y el susodicho conjugado en el marco de la fijación a la FBP soluble. A continuación de la reacción de competición, la FBP se pone en presencia de anticuerpos monoclonales anti-FBP y tiene lugar la reacción antígeno-anticuerpo. Dichos anticuerpos son acoplados de manera covalente a la carboximetilamilosa, un polianion. Así, los complejos son capturados por interacciones electrostáticas polianion-polication, sobre una matriz cargada positivamente. Sin embargo, la solicitante ha descubierto que la sensibilidad de esta dosificación no era plenamente satisfactoria, especialmente en lo que concierne a la cuantificación de pequeñas concentraciones de folatos.

10 EP1273917 describe derivados de folatos y su utilización en la dosificación de folato en muestras biológicas. Ciertos derivados portan un grupo carboxílico en posición alfa, otros derivados no tienen grupo metileno entre el grupo pterina y el grupo ácido p-amino-benzoico.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar la sensibilidad analítica de las inmunodosificaciones radio isotópicas del folato con el fin de obtener un procedimiento utilizable en las muestras de origen clínico (muestras biológicas) y/o en las muestras de origen agroalimentario que contienen una pequeña concentración de folato.

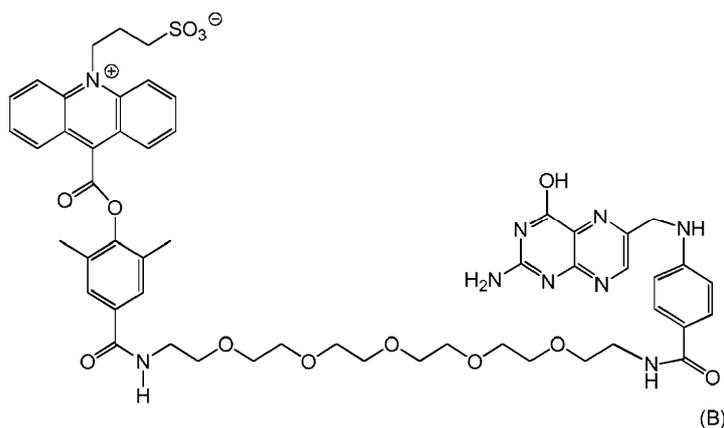
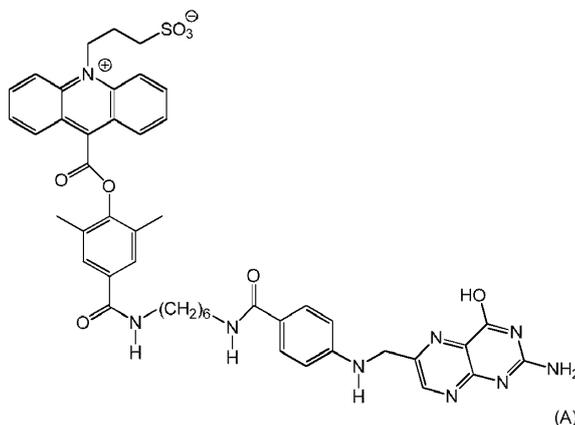
15 **Exposición de la invención**

La solicitante ha descubierto, contra lo esperado, nuevos derivados de folato que permiten paliar todo o parte de los inconvenientes mencionados anteriormente, en el sentido de que su utilización en una dosificación por competición no radio-isotópica (tal como una inmunodosificación), especialmente como trazador, permita obtener una sensibilidad analítica incrementada, en particular en las gamas de concentración de folato más bajas.

20 Así, se describe la utilización de un derivado de folato para dosificar el/los folato(s) in vitro en una muestra, tal como una muestra biológica, siendo dicha dosificación una inmunodosificación por competición no radio-isotópica y siendo descarboxilado dicho derivado de folato en posición α . Dicha posición α es tal como la representada en la fórmula general (G) anteriormente citada.

25 En efecto, la solicitante ha descubierto especialmente, de manera sorprendente, que los derivados del folato descarboxilados en posición α permitan mejorar de manera significativa la sensibilidad analítica de las inmunodosificaciones por competición no radio-isotópica permitiendo la dosificación in vitro del/de los folato(s).

Preferentemente, el derivado de folato según la invención es diferente de los compuestos NSP-DMAE-HD-pterato y NSP-DMAE-HEG-pterato representados respectivamente por las fórmulas (A) y (B) inferiores:



30

De manera ventajosa, el derivado de folato según la invención no comprende el motivo $-(O-CH_2-CH_2)-$ y es diferente del compuesto NSP-DMAE-HD-pterato representado por la fórmula (A) superior.

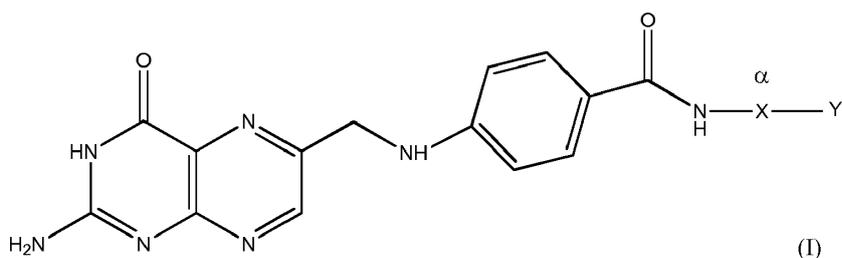
Tal como se indicó anteriormente, el prefijo « inmuno », por ejemplo en el seno del término « inmunodosificación », no se debe interpretar estrechamente como que designa un partícipe de unión de naturaleza y/o de origen inmunológico, tal como un anticuerpo. En efecto, el partícipe de unión utilizado en el ensayo inmunológico por competición puede ser efectivamente, por ejemplo, un receptor del analito que se desea dosificar, a saber el receptor de folatos. Las técnicas de inmunodosificación no radio-isotópicas aplicables según la presente invención pueden ser cualesquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia empleando un partícipe de unión que se una con suficiente afinidad al, al (a los) folato(s) para que la dosificación por competición se efectúe correctamente.

Según un modo de realización preferido, el derivado de folato según la invención se utiliza para dosificar una pluralidad de folatos, incluso, preferentemente, el folato total (tal como se ha definido anteriormente).

Según un modo de realización particular el derivado de folato según la invención se utiliza para dosificar el ácido fólico (ácido pteroil-monoglutámico).

Los términos « dosificar » y « dosificación » se refieren en la presente solicitud a la determinación de una cantidad/concentración del (de los) analito(s) de interés, a saber del/de los folato(s).

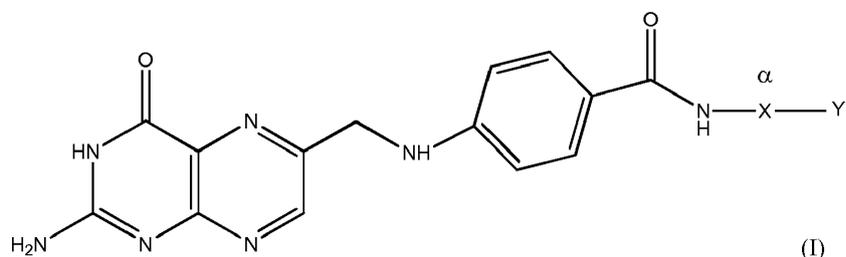
Se describe igualmente la utilización de un derivado de folato para dosificar el folato in vitro en una muestra tal como una muestra biológica, siendo dicha dosificación una inmunodosificación por competición, preferentemente no radio-isotópica, respondiendo dicho derivado de folato a la fórmula general (I):



en la que:

- X es una cadena hidrocarbonada alifática que comprende de 1 a 10 átomos de carbono en la que el carbono situado en posición α no porta una función acilo tal como una función ácido carboxílico;
- Y representa un grupo funcional adaptado para permitir el acoplamiento con una molécula distinta de M, tal como una proteína, comprendiendo dicho acoplamiento la formación de al menos un enlace covalente entre Y y un grupo funcional portado por dicha molécula distinta M.

La invención tiene por objeto la utilización de un derivado de folato para dosificar el/ o los folatos in vitro en una muestra biológica, siendo dicha dosificación una inmunodosificación por competición no radio-isotópica, y dicho derivado de folato responde a la fórmula general (I):



en la que:

- X es una cadena hidrocarbonada alifática que contiene 1 a 10 átomos de carbono, no conteniendo esta cadena hidrocarbonada más que hidrógeno y carbono; e
- Y representa un grupo funcional adaptado para permitir el acoplamiento con una molécula distinta M, tal como una proteína, comprendiendo dicho acoplamiento la formación de al menos una unión covalente entre Y y un grupo funcional portado por dicha molécula distinta de M, siendo Y un grupo de tipo centro electrófilo

o un grupo de tipo centro nucleófilo, preferentemente un grupo de tipo centro electrófilo, adaptado para permitir la formación de una unión amida, éster o tioéster, preferentemente amida o éster, ventajosamente amida, entre Y el grupo funcional portado por dicha molécula distinta M.

5 Por «cadena hidrocarbonada alifática», se entiende en el sentido de la presente invención, una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada abierta (acíclica). Conforme a la definición comúnmente admitida y que se presenta en los artículos de referencia, una cadena hidrocarbonada debe estar comprendida evidentemente en el seno de la presente invención, como que no contiene más que hidrógeno (H) y carbono (C). En otros términos, la cadena hidrocarbonada alifática X está funcionalizada únicamente por el grupo funcional Y anteriormente citado y no contiene, por definición, heteroátomos (tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, halógenos etc.).

10 La combinación de la desacilación (de la cual es un ejemplo la descarboxilación) en posición α del derivado de folato según la invención y de una cadena hidrocarbonada alifática que comprende 1 a 10 átomos de carbono tiene lugar en derivados de folato que permiten la obtención de una excelente sensibilidad analítica durante su empleo en las inmunodosificaciones por competición (de preferencia no isotópicas).

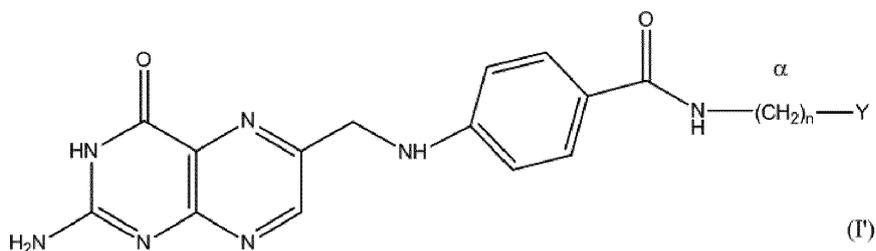
15 Dicha molécula M es, por ejemplo una molécula marcadora Mn. Esta molécula M puede consistir igualmente en un brazo químico o « linker ».

Preferentemente, X es una cadena hidrocarbonada que comprende de 2 a 7 átomos de carbono, preferentemente de 3 a 5 átomos de carbono, ventajosamente X es una cadena hidrocarbonada de 3 átomos de carbono o de 5 átomos de carbono.

Ventajosamente, X es una cadena hidrocarbonada saturada.

20 Preferentemente, X es una cadena hidrocarbonada lineal.

Según un modo de realización particularmente preferido, X es una cadena hidrocarbonada alifática, lineal y saturada, que comprende un número de átomos de carbono tal como el definido anteriormente. En otros términos, y según este modo de realización particularmente preferido, el derivado de folato según la invención se puede representar por la fórmula general (I') siguiente:

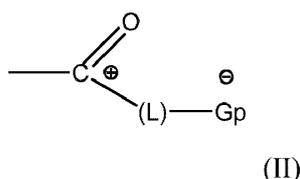


en la que:

- n es un número entero comprendido entre 1 y 10. Ventajosamente, n es un número entero comprendido entre 2 y 7, de preferencia entre 3 y 5, ventajosamente n representa el número entero 3 o 5.
- Y es tal como se ha definido anteriormente.

30 Tal como se indicó anteriormente, Y es un grupo de tipo centro electrófilo o un grupo de tipo centro nucleófilo, de preferencia un grupo de tipo centro electrófilo adaptado para permitir la formación de una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre Y y el grupo funcional portado por dicha molécula distinta.

35 Según un modo de realización preferido, Y es un grupo de tipo centro electrófilo, que responde a la fórmula general (II) siguiente:



en la que Gp es un grupo lábil, eventualmente unido a la función carbonilo por un brazo L, estando Gp adaptado para ser disociado del grupo de tipo centro electrófilo durante una reacción con un grupo nucleófilo portado por dicha molécula distinta M, tal como una amina primaria.

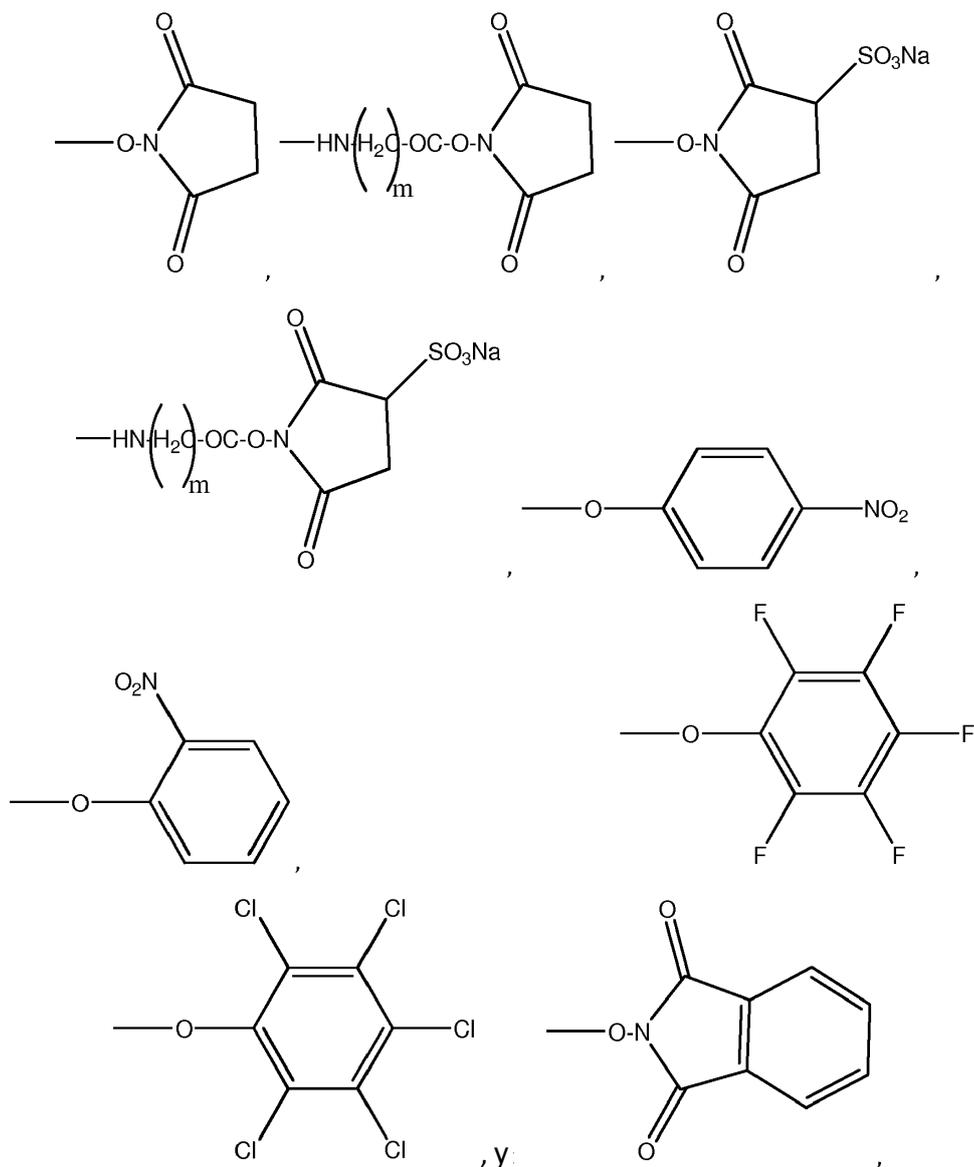
La presencia del brazo L es por lo tanto facultativa en el compuesto de fórmula general (II), razón por la cual este brazo L se representa entre paréntesis en dicha fórmula. Así, para los fines de la presente solicitud, el grupo de fórmula (L)-Gp puede designar por lo tanto un grupo de fórmula L-Gp (presencia del brazo L) o un grupo lábil Gp (ausencia de dicho brazo L).

- 5 De preferencia, dicha reacción del grupo de tipo centro electrófilo de fórmula general (II) con dicho grupo nucleófilo portado por dicha molécula M - tal como una amina primaria - es una reacción de sustitución nucleófila.

Siempre en el modo de realización preferido según el cual Y es un grupo de tipo centro electrófilo, el grupo (L)-Gp se elige entre los grupos adaptados para permitir la formación de una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre dicho grupo de tipo centro electrófilo y un grupo funcional portado por dicha molécula distinta M. De preferencia, este último es un grupo nucleófilo tal como una amina primaria.

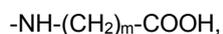
10

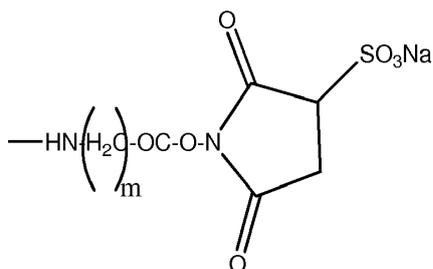
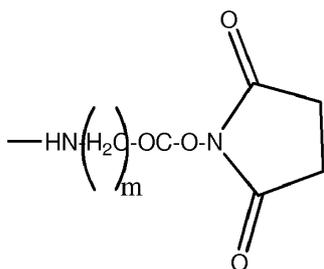
Ventajosamente, el grupo (L)-Gp se elige entre: -OH, -NH-(CH₂)_m-COOH, -N₃,



m es un número entero comprendido entre 1 y 10.

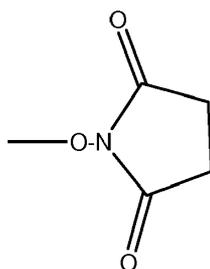
Entre los grupos (L)-Gp antes citados, el experto en la materia podrá distinguir, sin excesivas dificultades, los grupos lábiles Gp (tales como los grupos -OH, -N₃, y -N-oxi-succinimida) de los grupos L-Gp, a saber especialmente:





en el seno de los cuales el brazo L está constituido por la parte $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_m\text{-CO}$ (o $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_m\text{-OC}$).

5 Con fines de claridad, se advierte que el grupo denominado anteriormente « -N-oxi-succinimida » es el grupo de fórmula siguiente:

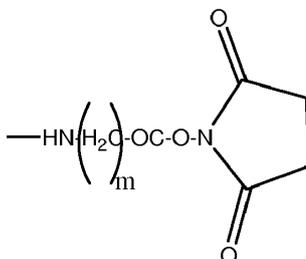


10 La utilización de tales grupos (L)-Gp permite favorecer la formación de una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre el grupo de tipo centro electrófilo Y y un grupo funcional portado por la molécula distinta M. Estos grupos (L)-Gp están patricularmente adaptados para permitir la formación de una unión amida entre dicho grupo de tipo centro electrófilo y una función amina - tal como una amina primaria - portada por la molécula M.

De preferencia, m está comprendida entre 1 y 5, ventajosamente entre 1 y 3.

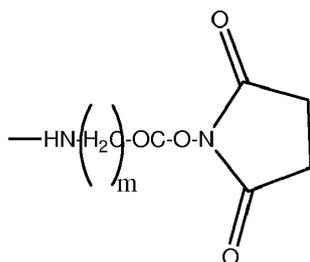
Ventajosamente, Y es un grupo de tipo centro electrófilo de fórmula general (II) y el grupo (L)-Gp se elige entre:

-OH y $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_m\text{-COOH}$ y



15 m está comprendido entre 1 y 10 y de preferencia m es igual a 1.

Según uno modo de realización particularmente preferido, Y es un grupo de tipo centro electrófilo de fórmula general (II) y (L)-Gp es el grupo L-Gp de fórmula siguiente:



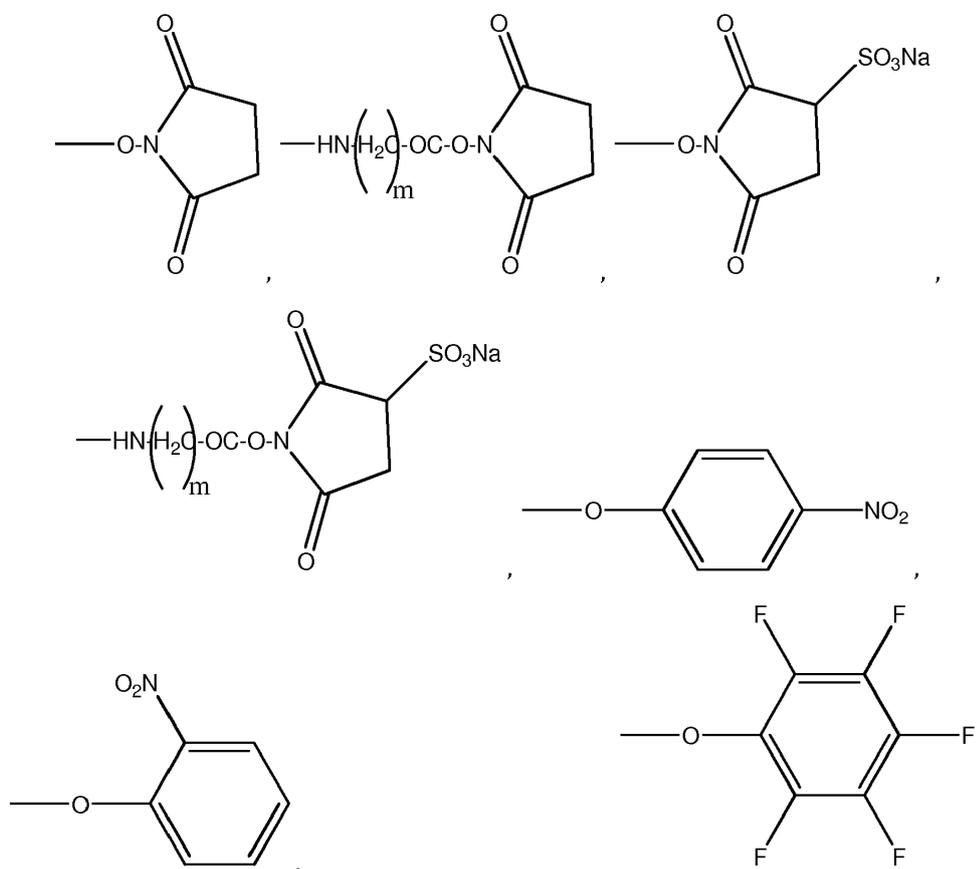
5 En otros términos, los derivados de folato de la invención se caracterizan por lo tanto por la fórmula general (I) tal como se ha dado anteriormente, en la que X es tal como se definió anteriormente e Y representa un grupo de acoplamiento activado o listo para ser activado para permitir la formación de una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre dicho derivado y un grupo funcional portado por dicha molécula distinta M.

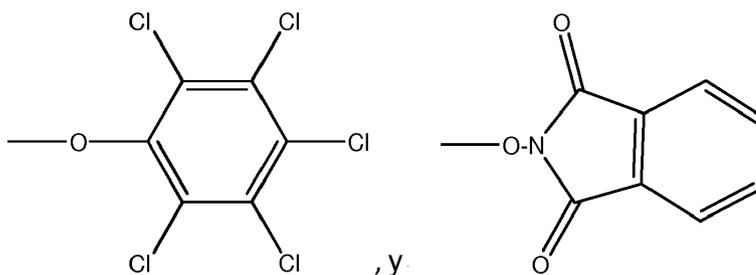
10 Según un modo de realización particularmente preferido, Y es un grupo de acoplamiento activado o listo para ser activado para permitir la formación de una unión amida con una amina primaria de dicha molécula M. En este modo de realización, las moléculas que se pueden acoplar con los derivados de folato de la invención son todas ellas moléculas que poseen naturalmente una amina primaria, tales como una proteína o bien todas las moléculas que fueron modificadas químicamente para incluir una amina primaria tal, por ejemplo, una biotina modificada, que presente una amina primaria.

15 Por «grupo de acoplamiento activado o listo para ser activado», se entiende un grupo funcional adaptado, dado el caso después de la activación, para permitir el acoplamiento del derivado de folato de la invención con el grupo funcional portado por dicha molécula distinta M (por ejemplo con una amina primaria portada por esta última).

Según un modo de realización particularmente preferido, Y es un grupo de acoplamiento activado que permite formar directamente una unión amida con un grupo funcional portado por la molécula M (por ejemplo una amina primaria), sin que este grupo tenga necesidad de ser modificado previamente. Como ejemplo, se pueden citar los grupos siguientes:

20 N_3 ,





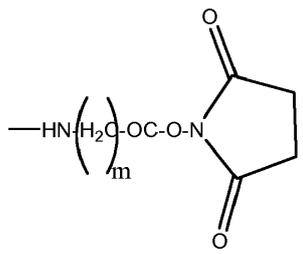
m es un número entero, comprendido preferentemente entre 1 y 10, lo que constituye un modo de realización de la invención.

5 Según una alternativa de la presente invención, Y es un grupo de acoplamiento listo para ser activado, a saber cualquier grupo que deba ser activado por métodos conocidos por el experto en la materia, para ser capaz de formar una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida.

10 Según un modo de realización particularmente preferido, Y es un grupo de acoplamiento listo para ser activado para formar una unión amida entre el derivado de folato según la invención y dicha molécula M. Tales grupos poseen un grupo -OH o -COOH. Como ejemplos, se pueden citar los grupos -OH y -NH-(CH₂)_m-COOH ; m es un número entero, comprendido preferentemente entre 1 y 10, lo que constituye un modo de realización de la invención.

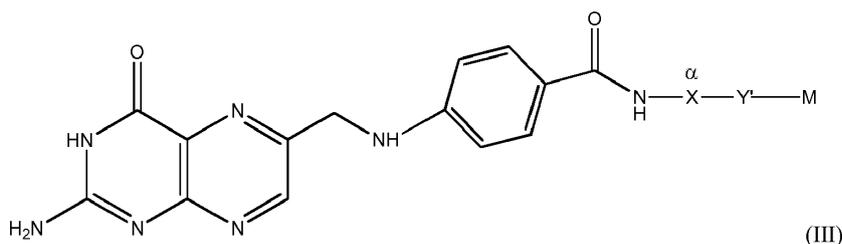
Según un modo de realización particular de la invención, m está comprendido entre 1 y 5, o también entre 1 y 3.

Según otro modo de realización, Y se elige entre -OH, -NH-(CH₂)_m-COOH, y



m está comprendido entre 1 y 10 y de preferencia es igual a 1.

15 Según otro modo de realización particularmente preferido, el derivado de fórmula general (I) se utiliza en forma de conjugado con dicha molécula M, y dicho conjugado está representado por la formula general (III) siguiente:

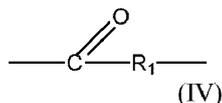


en la que X y M son tales como los definidos anteriormente, y en la que Y' es un derivado del grupo funcional Y después del acoplamiento del derivado de fórmula general (I) con dicha molécula M,

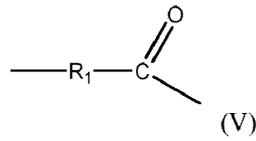
20 siendo preferentemente dicha molécula M una molécula marcadora Mm.

Este conjugado de fórmula general (III) es diferente del compuesto NSP-DMAE-HD-pteroato representado en la fórmula (A) superior.

De preferencia, Y' está representada por la fórmula general (IV) siguiente:

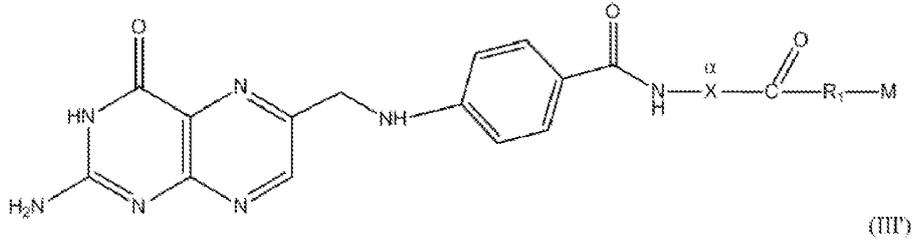


25 o por la formula general (V) siguiente:



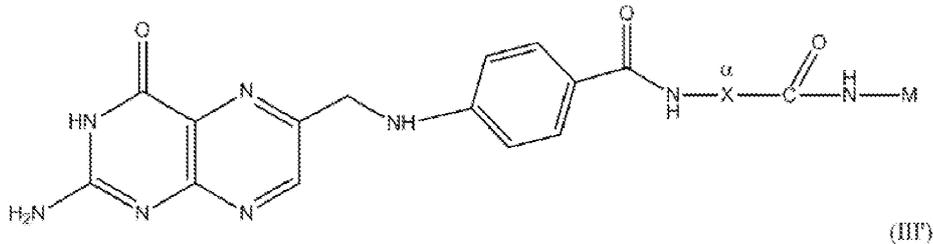
en las cuales R1 es -NH-, -O-, ó -S-, de preferencia -NH- u -O-, ventajosamente -NH- ;
de preferencia Y' está representada por la fórmula general (IV).

5 Cuando Y' corresponde a la fórmula general (IV), el conjugado según la invención puede estar representado por la fórmula general (III') siguiente:



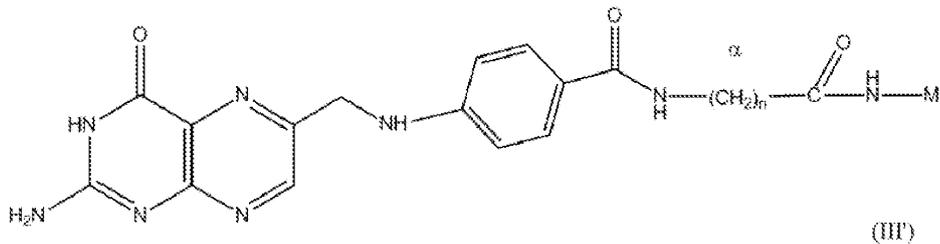
en la que X, R1 y M son tales como se han definido anteriormente.

Según un modo de realización particularmente preferido, R1 es -NH- y la fórmula (III') es como sigue:



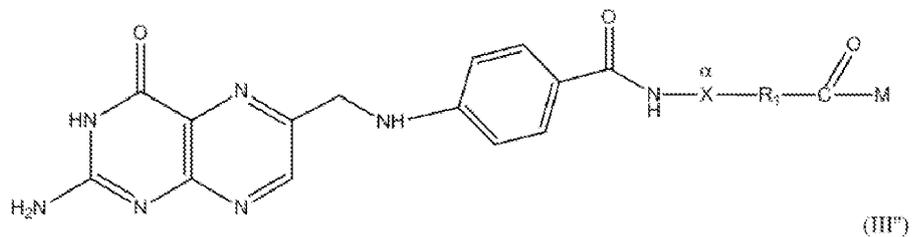
10 en la que X y M son tales como se han definido anteriormente.

Según un modo de realización particularmente preferido, siempre que Y' sea un grupo de fórmula general (IV), X es -(CH2)n- y el conjugado según la invención está representado por la fórmula general (III''') siguiente:



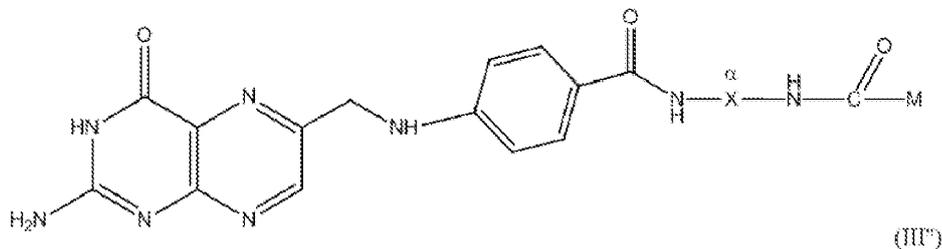
15 en la que M y n son tales como se han definido anteriormente. Así, n es un número entero comprendido entre 1 y 10. Según un modo de realización preferido, n es un número entero comprendido entre 2 y 7, de preferencia entre 3 y 5, ventajosamente n es el número entero 3 o 5.

Cuando Y' corresponde a un grupo de fórmula general (V), el conjugado según la invención está representado por la fórmula general (III''') :



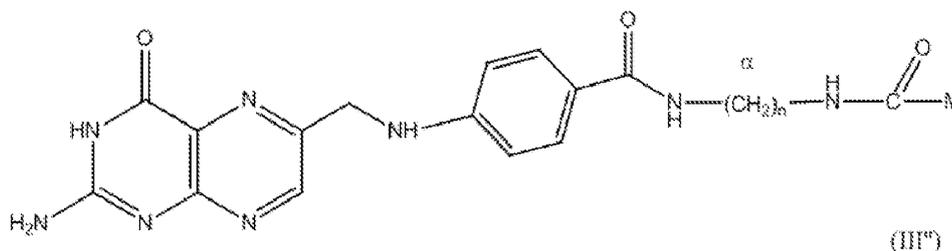
en la que X, R₁ y M son tales como se han definido anteriormente.

Según un modo de realización preferido, R₁ es -NH- y el conjugado según la invención responde entonces a la fórmula (III'') siguiente:



5 en la que X y M son tales como se han definido anteriormente.

Según un modo de realización particularmente preferido, X es -(CH₂)_n y el conjugado según la invención responde a la fórmula general (III''') siguiente:



10 en la que M y n son tales como se han definido anteriormente. Así, n es un número entero comprendido entre 1 y 10. Según un modo de realización preferido, n es un número entero comprendido entre 2 y 7, de preferencia entre 3 y 5, ventajosamente n es el número entero 3 o 5.

Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de dosificación *in vitro* del/de los folato(s) en una muestra, tal como una muestra biológica, siendo dicha dosificación una inmunodosificación por competición no radioisotópica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 15 a) poner en presencia, en el seno de dicha muestra biológica, (i) al menos un partícipe de unión del/de los folato(s), tal como un anticuerpo adaptado para unirse al/a los folatos) o tal como el receptor de los folatos, con (ii) al menos un compuesto elegido entre un derivado de folato tal como se ha definido anteriormente y un conjugado según la invención, estando adaptado al menos uno de dichos compuestos (i) e (ii) para emitir una señal,
- b) eventualmente dejar un plazo de tiempo suficiente para permitir la reacción de competición,
- 20 c) medir la intensidad de la señal y deducir de ella la concentración de folato(s) presente en dicha muestra biológica en relación a una curva de calibración que establece una relación entre intensidad de la señal medida y concentración de folato(s).

Este procedimiento de dosificación se puede emplear en una muestra biológica clínica, a saber obtenida a partir de un paciente humano o animal. Además, este procedimiento de dosificación se puede aplicar igualmente para la dosificación del/de los folato(s) en muestras de origen agroalimentario tales como los alimentos destinados a la alimentación humana o animal incluidos los complementos alimentarios. De una manera general, el procedimiento de dosificación según la invención es aplicable cada vez que se desee o sea necesaria una dosificación del o de los folato(s) en el seno de una muestra dada.

30 Cualquiera que sea la muestra, de origen clínico o de origen alimentario, la dosificación de los folatos requiere una etapa previa de tratamiento de la muestra con el fin de disociar los folatos de otras moléculas presentes en estas muestras y con las cuales interactúan. Tales técnicas de disociación son bien conocidas por el experto en la materia. Como ejemplo, podemos citar la patente europea EP 0382334 que divulga un método de preparación de las muestras de suero para las dosificaciones de la vitamina B12 y de los folatos. La patente US 4,418,151 divulga un método de pretratamiento alternativo. La reseña del kit Abbott Axsym Folate (Cat. N° B7K460, Abbott Laboratories) describe un protocolo de preparación de un hemolizado a partir de una muestra de sangre entera con el fin de hacer accesible a la dosificación todas las moléculas de folato presentes en los eritrocitos.

El experto en la materia, que conoce bien las técnicas de inmunodosificación por competición no radioisotópica, podrá, sin excesiva dificultad, ejecutar las etapas b) y c). En particular, sabrá perfectamente cómo se construye una

curva de calibración sobre la base de muestras que contienen concentraciones conocidas de folato(s), estableciendo así una relación entre intensidad de la señal medida y concentración de folato(s).

Tal como se mencionó anteriormente, la dosificación inmunológica por competición (denominada igualmente « inmunodosificación por competición ») es una dosificación ampliamente conocida por el experto en la materia.

5 Consiste en dosificar el analito, aquí el folato, en una muestra de interés, creando una competición entre el analito de la muestra y un derivado de este analito, aquí el derivado de folato según la invención, frente a la fijación a un partícipe de unión de origen inmunológico (por ejemplo un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) o no (por ejemplo el receptor de folatos). La unión del derivado del analito de interés y del partícipe de unión se pone en evidencia gracias a la presencia de un trazador.

10 El derivado del analito (a saber el derivado de folato) se puede utilizar en la reacción de competición, como se ha indicado anteriormente, sin acoplamiento previo o después del acoplamiento a un marcador para formar un conjugado o trazador.

15 Cuando el derivado del analito (a saber el derivado de folato) no está acoplado a un marcador (en cuyo caso no constituye el trazador más bien el partícipe de captura), el partícipe de unión es marcado entonces para constituir el trazador de la reacción. Cuando el derivado del analito (a saber el derivado de folato) está acoplado a un marcador (a saber a una molécula marcadora Mm) para formar un conjugado, este último constituye entonces el trazador y el partícipe de unión se convierte entonces en el partícipe de captura.

La señal medida, emitida por el trazador, es entonces inversamente proporcional a la cantidad de folato(s) presente(s) en la muestra a dosificar.

20 Como partícipe de unión del (de los) folato(s), se utiliza cualquier molécula capaz de unirse al (a los) folato(s). Como ejemplos de partícipes de unión al (a los) folato(s), se pueden citar los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos, las nanofitinas, el receptor de los folatos o cualquier otra proteína conocida para unirse a los folatos con una afinidad suficiente para realizar la inmunodosificación por competición no radio-isotópica según la invención.

25 Cuando como partícipes de unión se utilizan anticuerpos, estos últimos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales.

30 Los anticuerpos policlonales se pueden obtener por inmunización de un animal con, como inmunógeno, el folato diana, seguida por la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los demás constituyentes del suero, especialmente por cromatografía de afinidad en una columna sobre la cual se ha fijado un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, especialmente el inmunógeno.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por la técnica de los de las hibridomas ampliamente conocidas por el experto en la materia. Los anticuerpos monoclonales pueden ser igualmente anticuerpos recombinantes obtenidos por técnica genética, por técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

35 Como ejemplo de fragmentos de anticuerpos, se pueden citar los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ así como las cadenas scFv (Single chain variable fragment), dsFv (Double-stranded variable fragment). Estos fragmentos funcionales se pueden obtener especialmente por técnicas genéticas.

Las nanofitinas (nombre comercial) son pequeñas proteínas que, como los anticuerpos, son capaces de unirse a una diana biológica permitiendo así detectarla, capturarla o simplemente dirigirla al seno de un organismo.

40 Los partícipes de unión utilizados pueden ser específicos o no del (de los) folato(s). Se denominan específicos cuando son capaces de unirse de forma exclusiva o casi exclusiva a los folatos. Se denominan no específicos cuando la selectividad de unión al (a los) folato(s) es débil y son capaces de unirse a otros ligandos tales como proteínas o anticuerpos. Según un modo de realización preferido, en el marco del procedimiento de inmunodosificación no radio-isotópica según la invención, se utiliza al menos un partícipe de unión específico.

45 Los partícipes de unión o los derivados de folatos según la invención, cuando se utilizan en captura, se pueden unir o no a un soporte por cualquier técnica conocida por el experto en la materia.

La segunda etapa b) del procedimiento de la invención es una etapa clásica de un procedimiento de inmunodosificación por competición.

50 La última etapa c) del procedimiento según la invención consiste en determinar la concentración de folato(s). La señal medida es inversamente proporcional a la cantidad de folato(s) en la muestra. Con el fin de determinar la concentración de folato(s), la intensidad de la señal se mide y esta intensidad se compara con una curva de calibración obtenida previamente por técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia. Así, por ejemplo, la curva de calibración se obtiene efectuando una inmunodosificación por competición utilizando el mismo partícipe de unión, así cantidades crecientes de folato(s). Así se obtiene una curva, por ejemplo poniendo en abscisas la concentración de folato(s) y en ordenadas la señal correspondiente obtenida después de la inmunodosificación.

Cuando el compuesto (ii) es un conjugado según la invención, tal como se ha descrito anteriormente, lo que constituye un modo de realización de la invención, la señal se genera por el marcado de la molécula marcadora Mm, tal como se ha descrito anteriormente.

- 5 Cuando el compuesto (ii) es un derivado de folato de la invención, tal como se ha descrito anteriormente, es decir que no está ligado a una molécula marcadora Mm, la señal consiste en la lectura directa de la unión partícipe de unión/derivado de folato, que puede realizarse especialmente por resonancia plasmónica de superficie o por voltametría cíclica.

De preferencia, el compuesto (ii) es un conjugado según la invención.

- 10 Tal como se ha indicado anteriormente, los derivados y conjugados de folatos según la invención se pueden utilizar uno/varios folatos en el seno de una muestra. De preferencia, estos derivados conjugados se utilizan para dosificar una pluralidad (al menos dos) folatos, a saber varias formas de folatos (especialmente folatos reducidos) en el seno de dicha muestra.

Según un modo de realización particular de la invención, los derivados conjugados de folato mencionados se utilizan para dosificar el folato total en una muestra.

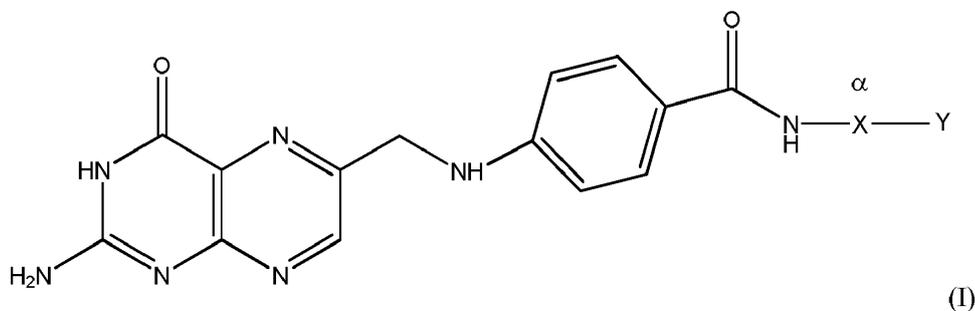
- 15 La invención se refiere igualmente a un método de diagnóstico *in vitro* que tiene por objeto determinar si un paciente humano o animal, preferentemente humano, presenta una deficiencia de folato(s), comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- 20 a) en el seno de una muestra biológica, de preferencia sangre entera, plasma o suero, obtenida a partir de dicho paciente, dosificar el/los folato(s) empleando el procedimiento de dosificación *in vitro* según la invención, con el fin de deducir la concentración de folato(s) en la muestra biológica,

b) comparar dicha concentración con un valor umbral, que corresponde a una concentración predeterminada de folato(s) por debajo de la cual un paciente se considera carente de folato(s), y

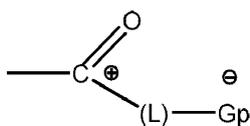
c) si la concentración dosificada es inferior a dicho valor umbral, deducir que el paciente presenta una carencia de folato(s).

- 25 Otro objeto de la invención se refiere a un derivado de folato de fórmula general (I), adaptado para ser utilizado en una inmunodosificación no radio-isotópica:



en la que:

- X es tal como se ha definido anteriormente;
 - Y es un grupo de centro electrófilo o de tipo centro nucleófilo, de preferencia un grupo de tipo centro electrófilo, adaptado para permitir la formación de una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre Y y un grupo funcional portado por una molécula distinta M; y en la que:
 - cuando X es una cadena hidrocarbonada lineal y saturada que comprende un número de átomos de carbono igual a 2, Y no es un grupo $-(O-CH_2-CH_2)_2-NH_2$;
 - cuando Y es un grupo de tipo centro nucleófilo consistente en una amina primaria, X comprende un número de átomos de carbono diferente de 6,
 - cuando Y es un grupo de tipo centro electrófilo, este último responde a la fórmula general (II) siguiente:
- 30
- 35



(II)

- 5 en la que Gp es un grupo lábil, eventualmente unido a la función carbonilo por un brazo L, estando adaptado Gp para ser disociado del grupo de tipo centro electrófilo durante una reacción con un grupo nucleófilo portado por dicha molécula distinta M, tal como una amina primaria, y en el cual, cuando L está ausente y Gp es -OH, X comprende un número de átomos de carbono superior a 4.

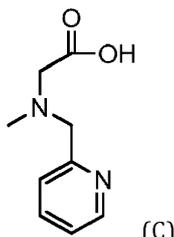
Según un modo de realización particular, el grupo funcional Y no comprende el motivo -(O-CH₂-CH₂)-.

Este derivado de folato de fórmula general (I) está adaptado para la realización de una inmunodosificación por competición no radio-isotópica del/de los folatos en una muestra. Por lo tanto, no incluye radio-isótopo/radio-elemento.

- 10 Dicho derivado de folato de fórmula general (I), como tal, no está marcado. Dado el caso, dicho derivado de folato será marcado después del acoplamiento con una molécula marcadora Mm, comprendiendo dicho acoplamiento la formación de un enlace covalente entre el grupo funcional Y de dicho derivado de folato y un grupo funcional portado por dicha molécula marcadora Mm.

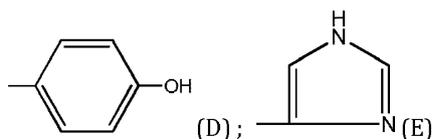
- 15 El derivado de folato de fórmula general (I) es diferente del compuesto NSP-DMAE-HD-pterato representado por la fórmula (A) superior.

Según un modo particular de realización, Y es diferente del grupo (C):



(C)

Según otro modo de realización particular, cuando X es una cadena hidrocarbonada lineal y saturada que comprende un número de átomos de carbono igual a 2, Y es diferente de los grupos (D) y (E) siguientes:

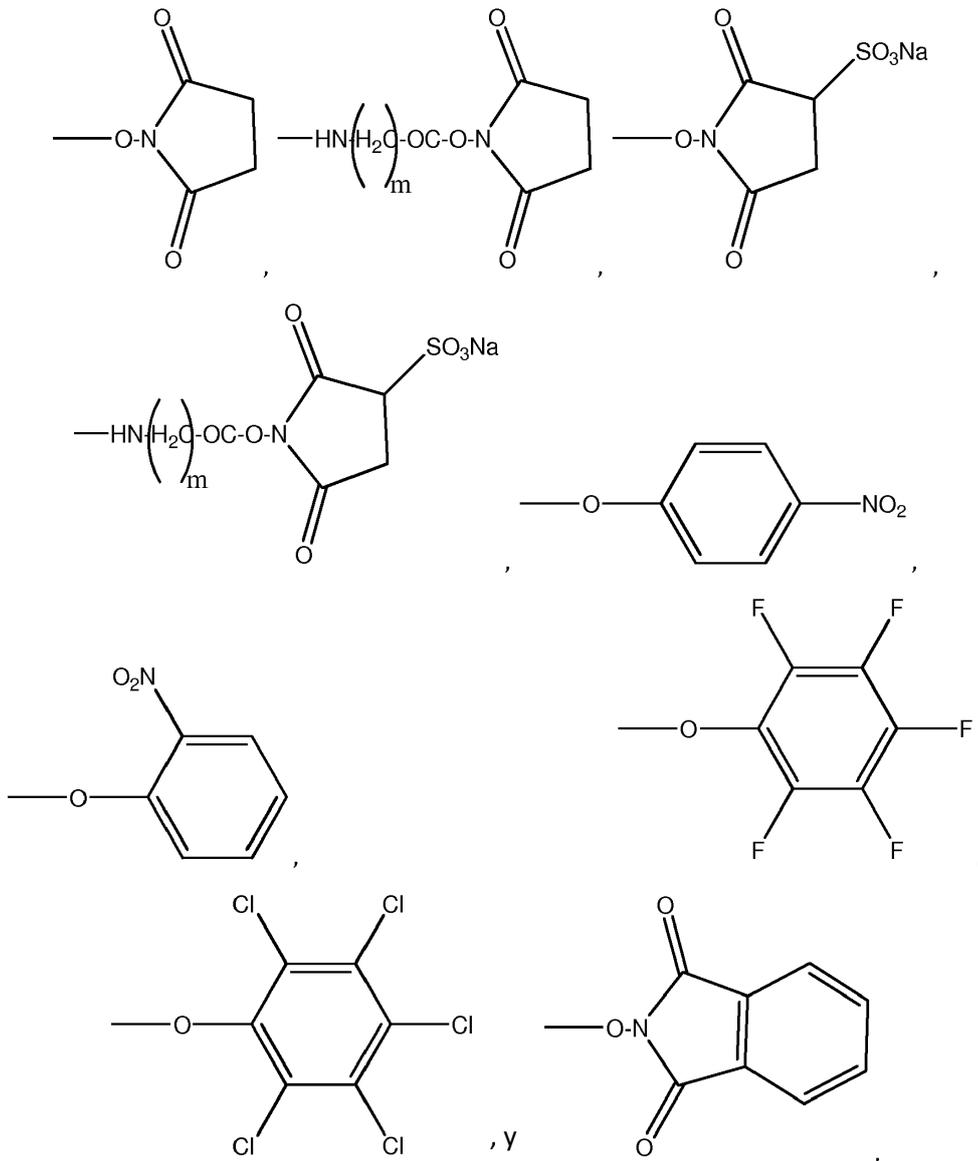


- 20 Según una variante de este « otro modo de realización particular », Y es diferente de los grupos (D) y (E) antes mencionados, y esto cualquiera que sea la definición de X.

De preferencia, dicha reacción del grupo de tipo centro electrófilo de fórmula general (II) con dicho grupo nucleófilo soportado por dicha molécula M - tal como una amina primaria - es una reacción de sustitución nucleófila.

- 25 Según un modo de realización particular, cuando Y es un grupo de tipo centro nucleófilo, este último consiste en un grupo funcional diferente de una amina primaria.

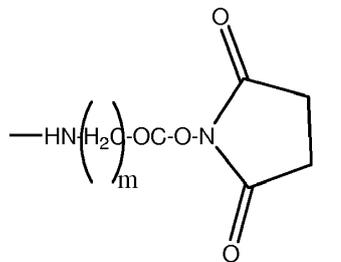
Según un modo de realización preferido, cuando Y es un grupo de tipo centro electrófilo que responde a la fórmula general (II), (L)-Gp es un grupo elegido entre: -OH, -NH-(CH₂)_m-COOH, -N₃,



- 5 siendo m un número entero comprendido entre 1 y 10, de preferencia comprendido entre 1 y 5, ventajosamente comprendido entre 1 y 3, en el cual cuando L está ausente y Gp es -OH, X comprende un número de átomos de carbono superior a 4.

De preferencia, cuando Y es un grupo de tipo centro electrófilo de fórmula (II), (L)-Gp se elige entre:

-OH y -NH-(CH₂)_m-COOH y

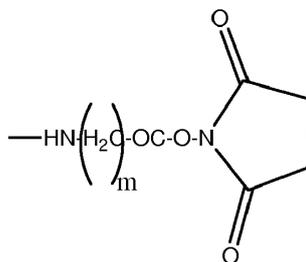


10

estando comprendido m entre 1 y 10 y de preferencia m es igual a 1,

en el cual, cuando L está ausente y Gp es -OH, X comprende un número de átomos de carbono superior a 4.

Según un modo de realización particularmente ventajoso, cuando Y es un grupo de tipo centro electrófilo de fórmula (II), (L)-Gp es :



5 Según un modo de realización particular, y siempre que Y sea un grupo de tipo centro electrófilo de fórmula general (II), Gp es un grupo diferente de un grupo -OH (grupo hidroxilo).

La invención se refiere igualmente a un conjugado que comprende un derivado de folato según la invención y una molécula distinta M, estando ligados dicho derivado y dicha molécula M por al menos una unión amida, éster o tioéster, de preferencia una unión amida o éster, ventajosamente por una unión amida, entre Y y un grupo funcional portado por dicha molécula M.

10 Según un modo de realización particularmente preferido, dicha molécula M se elige entre los brazos químicos o « linkers » o entre las moléculas marcadoras M_m , siendo preferentemente dicha molécula M una molécula marcadora M_m que permite el marcado directo o indirecto de dicho derivado de folato (denominándose entonces este último « conjugado marcado »).

15 Otro objeto de la invención se refiere a un kit que permite el empleo del procedimiento según la invención, dicho kit comprende:

- (i) al menos un partícipe de unión del (de los) folato(s), tal como un anticuerpo adaptado para unirse a los folatos o tal como el receptor de folatos,
- (ii) al menos un compuesto elegido entre un derivado de folato tal como se ha definido anteriormente y un conjugado según la invención,

20 • estando adaptado al menos uno de dichos compuestos (i) e (ii) para emitir una señal,

y

- al menos un medio de calibración.

25 Bien entendido, este kit (igualmente denominado « equipo de detección ») puede comprender otros constituyentes que permitan o favorezcan la utilización de la inmunodosificación según la invención, tales como, por ejemplo, tampones de lavado y uno u otros varios reactivos que permitan la visualización del marcado o la emisión de una señal detectable.

Los derivados de folato de la invención se pueden utilizar de dos maneras diferentes en los procedimientos de dosificación del (de los) folato(s) por inmunodosificación por competición, tales como las pruebas diagnósticas. En efecto, o bien son utilizadas tal cual, o bien son utilizadas acopladas a otra molécula para formar un conjugado.

30 Dicha « otra molécula » es o bien un marcador directo o indirecto, o bien un brazo químico o « linker », o bien un compuesto químico cuyo acoplamiento con un derivado de folato presenta un interés, especialmente para la utilización de una dosificación del folato por inmunodosificación por competición (de preferencia no radio-isotópica).

35 Así, la presente invención tiene igualmente por objeto los conjugados que comprenden o que están constituidos por un derivado de folato tales como los descritos anteriormente, y por otra molécula, en particular de un marcador o de un brazo químico.

Por marcador se entiende cualquier molécula capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos marcadores de detección consiste en :

- 40 • las enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
- los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,
- las moléculas fluorescentes tales como las Alexa o las ficocianinas,

- las sales electroquimioluminiscentes tales como los derivados organometálicos a base de acridinio o de rutenio.

5 Se pueden utilizar igualmente sistemas indirectos de detección, como por ejemplo ligandos capaces de reaccionar con un antiligando. El ligando corresponde entonces a la molécula marcadora Mn para constituir, con el derivado de folato mencionado supra, el conjugado de la invención.

Los acoplamientos ligando/antiligando son bien conocidos por el experto en la materia. A modo de ejemplo, se pueden citar especialmente los acoplamientos siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido.

10 El antiligando puede ser entonces directamente detectable por los marcadores de detección directos descritos anteriormente o ser detectable, por sí mismo, por otro acoplamiento ligando-antiligando, y así sucesivamente.

Estos sistemas de detección indirectos pueden conducir, en ciertas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá hacer referencia especialmente a las anteriores solicitudes de patente FR98/10084 y WO-A-95/08000 de la solicitante.

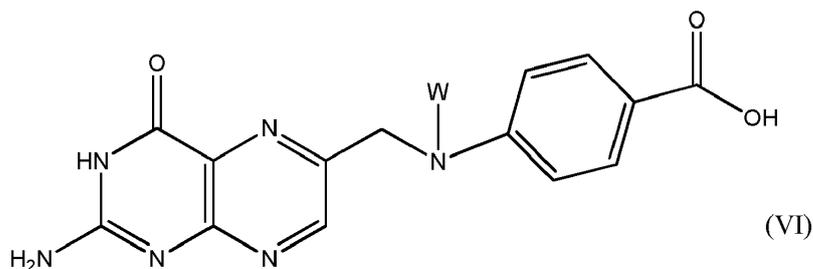
15 Según el tipo de marcado utilizado, el experto en la materia ajustará los reactivos que permitan la visualización del marcado o la emisión de una señal detectable por cualquier tipo de aparato de medida apropiado, como por ejemplo un espectrofotómetro, un espectrofluorímetro o también una cámara (por ejemplo una cámara de alta definición). Por brazo químico o « linker », se entiende cualquier molécula que se pueda acoplar con el derivado según la presente invención, siendo además dicha molécula capaz de fijarse sobre una fase sólida de manera covalente o no covalente, de manera selectiva o no selectiva.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, los derivados de folato y los conjugados correspondientes según la presente invención son particularmente útiles para la detección *in vitro* de la concentración de folato(s) en una muestra de origen clínico (por ejemplo una muestra biológica procedente de un paciente humano o animal) o de una muestra agroalimentaria (procedente de un alimento o de un complemento alimentario).

25 La determinación de la concentración de folato(s) utilizando el derivado o el conjugado según la presente invención se podrá realizar en el sobrenadante de cultivo o también en el lisado celular.

La descripción describe igualmente un procedimiento de obtención de un derivado según la invención, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- a) sintetizar a partir del ácido pterico el compuesto de fórmula general (VI) :

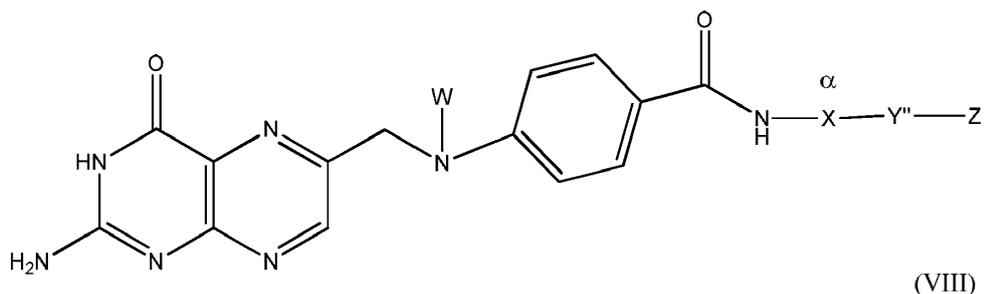


30 en la que W representa un grupo que incrementa la solubilidad de dicho compuesto en disolvente(s) orgánico(s), tal como un grupo trifluoroacetilo (COCF₃),

- b) poner a reaccionar dicho compuesto de fórmula (VI), obtenido en la etapa a), con un compuesto de fórmula general (VII) siguiente:



35 en condiciones que permitan obtener, por acoplamiento, el compuesto de fórmula general (VIII) siguiente:



siendo x como se ha definido anteriormente,

siendo Z un grupo inerte, de preferencia alquilo o arilo, e

5 siendo Y'' un derivado del grupo Y (tal como el definido supra) después del ligamiento con dicho grupo Z.

c) desproteger, en condiciones que permita esta desprotección, el compuesto de fórmula (VIII), con el fin de obtener el derivado de folato de fórmula (I) según la invención.

Según un modo de realización preferido, se pone a reaccionar en la etapa b), dicho compuesto de fórmula (VI), obtenido en la etapa a), con un compuesto de fórmula general (VII) siguiente:



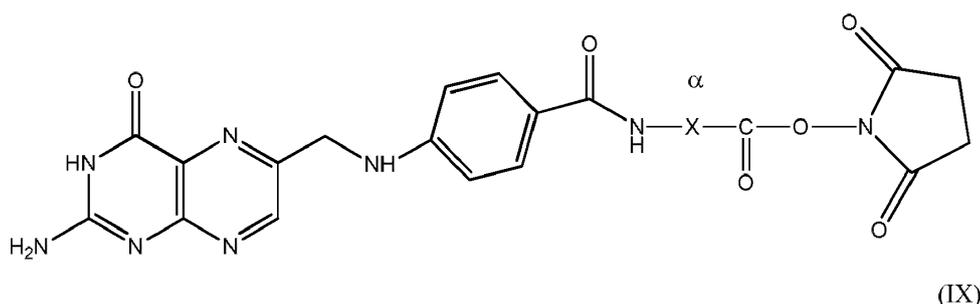
en la que Y'' es -C(O)O-,

con el fin de preparar un derivado de folato de fórmula (I), en el cual Y es -COOH.

15 En este modo de realización preferido, si Z es un grupo metilo o etilo, Y-Z es respectivamente -C(O)O-CH₃ o -C(O)O-CH₂-CH₃ en los compuestos de fórmulas (VII) y (VIII). Si Z es un grupo arilo, entonces Y-Z es -C(O)O-Ar en el seno de estos compuestos (simbolizando Ar este grupo arilo).

Al final de la etapa de desprotección c), y siempre en este modo de realización preferido, el susodicho grupo -C(O)O- da como resultado un grupo -COOH. El derivado de folato de fórmula general (I) según la invención, así obtenido, se denomina derivado de folato « ácido ». Según un aspecto preferido de este modo de realización, el procedimiento comprende entonces, después de la etapa c), la etapa adicional siguiente:

20 d) obtener, a partir de este derivado de folato ácido (en el cual Y = -COOH), el éster del derivado de folato -NHS, a saber el compuesto que responde a la fórmula general (IX) siguiente:



en la que X es tal como se ha definido anteriormente.

25 Este compuesto de fórmula general (IX) representa uno de los derivados de folato preferidos, incluso el derivado de folato preferido en el seno de la presente invención. Ventajosamente, X es una cadena hidrocarbonada alifática, lineal y saturada que comprende un número de átomos de carbono comprendido entre 1 y 10, de preferencia entre 2 y 7, ventajosamente entre 3 y 5.

30 Los métodos de obtención de los ésteres NHS (N-hidroxisuccinimidias) son bien conocidos por el experto en la materia. Ejemplos de obtención de derivados de folato de fórmula (IX) según la invención se presentan a continuación (cf. ejemplos 3 y 4 infra), a título ilustrativo y no limitativo.

El ácido pterico es un compuesto disponible en el comercio. Desgraciadamente, este compuesto resulta poco soluble en los disolventes orgánicos corrientes. Por lo tanto, este último se transforma, en la etapa a), en un compuesto de fórmula general (VI) para facilitar la continuidad del presente procedimiento. De preferencia, este

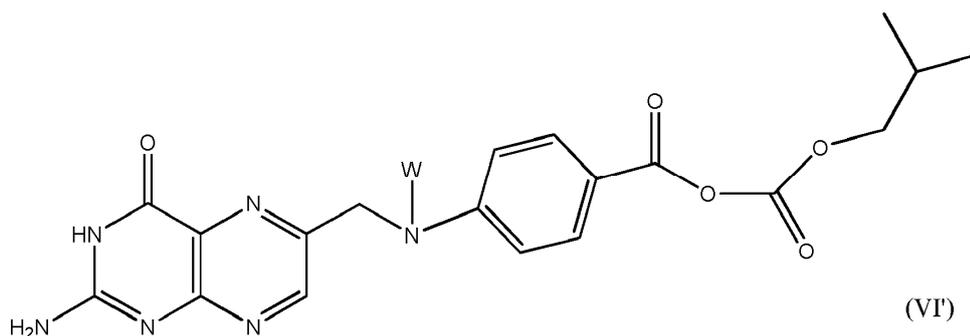
compuesto de fórmula (VI) es el ácido N-trifluoroacétilpteroico ($W = -\text{COCF}_3$). En este caso, el ácido pterico se hace reaccionar, de preferencia, con anhídrido trifluoroacético, ventajosamente bajo protección de nitrógeno.

Tal como se indicó anteriormente, la etapa b) se realiza en condiciones reactivas que permiten obtener la reacción deseada. Estas condiciones reactivas incluyen, de preferencia, la utilización de un agente de acoplamiento.

- 5 Tal como se indicó anteriormente, el grupo inerte Z consiste, por ejemplo, en un grupo metilo o etilo (especialmente cuando Y'' es $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, para dar $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{Me}$ ó $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{Et}$) o en un grupo Fmoc (especialmente cuando Y'' es $-\text{NH}-$, para dar $-\text{NH}-\text{Fmoc}$).

Según un modo de reacción particular, la etapa b) comprende las dos etapas siguientes:

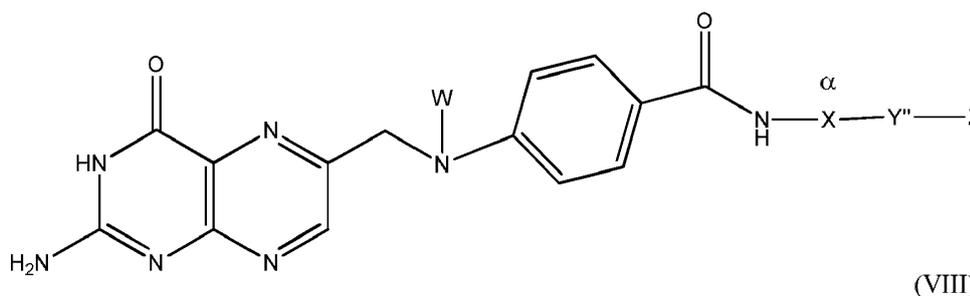
- 10 b.1) formar, a partir del compuesto de fórmula (VI) obtenido en la etapa a), un intermediario activo tal como el isobutilformiato del ácido N-trifluoroacétilpteroico de fórmula general (VI') siguiente:



b.2) poner a reaccionar este intermediario activo obtenido en la etapa b.1) con un compuesto de fórmula general (VII) siguiente:



- 15 en condiciones que permitan obtener, por acoplamiento, el compuesto de fórmula general (VIII) siguiente:



en la que W, X, Y'' y Z son tales como se han definido anteriormente.

Según uno modo de reacción preferido, después de las etapas b) y/o b.2) antes citadas, el acoplamiento se obtiene por transamidificación.

- 20 La etapa de desprotección c) resulta de la eliminación del grupo W y, de manera concomitante o subsiguiente, del grupo Z, ventajosamente bajo protección de nitrógeno.

Esta etapa de desprotección c) se efectúa de preferencia en medio básico, por ejemplo en una solución de NaOH. Esta solución básica permite la eliminación del grupo W y, de manera concomitante, del grupo Z (consistente por ejemplo en un grupo metilo o etilo), por reacción de saponificación.

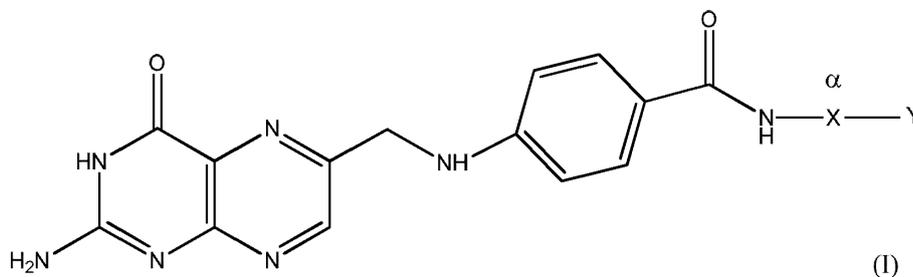
25 Descripción detallada

La invención se entenderá mejor con ayuda de los ejemplos siguientes que se dan a título ilustrativo y no limitativo, en referencia a las figuras 1 y 2, en las cuales:

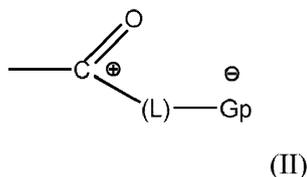
- la figura 1 presenta las etapas de síntesis del folato-C4-ácido (ácido 4-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido) butanoico) y del folato C4-NHS, y
- 30 • la figura 2 presenta las etapas de síntesis del folato-C6-ácido (ácido 6-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido) hexanoico) y del folato-C6-NHS.

Ejemplo 1: Preparación del ácido 4-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)butanoico (folato-C4-ácido)

Con fines de claridad, el compuesto denominado « folato-C4-ácido » es un derivado según la invención que responde a la fórmula general (I) siguiente:



en la que X es una cadena hidrocarbonada alifática, lineal y saturada, que comprende 3 átomos de carbono, e Y es un grupo de tipo centro electrófilo que responde a la fórmula general (II):



en la que L está ausente y Gp es -OH.

10 1.1. Introducción

Los reactivos ácido pterico (CAS-Nº. 119-24-4), anhídrido trifluoroacético (CAS-Nº.407-25-0), metil 4-aminobutirato (CAS-Nº. 3251-07-8), cloroformiato de isobutilo (CAS-Nº. 543-27-1), ácido amino-6-hexanoico (CAS-Nº. 60-32-2 denominado también ácido 6-aminocaproico) y diclorometano anhidro (CAS-Nº. 75-09-2) se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

15 En cada etapa de síntesis, se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para seguir el avance de la reacción y el análisis de los productos. La columna utilizada es una Vydac 218TP54, C18, 250x4.6mm, 5µm y el eluyente es una mezcla de acetonitrilo, agua (0,1% ácido trifluoroacético) en gradiente.

1.2. Etapa 1 : obtención del ácido N-trifluoroacetilpterico

20 En un matraz de 50 mL provisto de agitación magnética, de una entrada y una salida del nitrógeno de protección, se introducen 500 mg (1,60 mmoles) de ácido pterico. Se añaden 10mL de anhídrido trifluoroacético bajo protección de nitrógeno, gota a gota durante 30 minutos. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas al abrigo de la luz. El medio de reacción se evapora a presión reducida a temperatura ambiente y el residuo se seca a vacío durante 1 hora. El producto obtenido se lava con 5 mL de éter etílico, después se seca a vacío. El producto se analiza en HPLC y se utiliza directamente para la continuación de la síntesis.

25 1.3. Etapa 2 : obtención del N-trifluoroacetil-folato-C4-Me

30 Una mezcla de 171 mg (0,42 mmoles) de ácido N-trifluoroacetilpterico, 0,111 mL de trietilamina (CAS-Nº. 121-44-8) y 2 mL de dimetilformamida seca (DMF, CAS-Nº. 68-12-2) se prepara y se agita a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 45 minutos para dar el medio nº1. En otro matraz de 10 mL, se mezclan 150 mg (0,98 mmoles) de metil 4-aminobutirato hidrocloreuro con 2 mL de DMF seco, después se añaden 0,111 mL de trietilamina. Después de una agitación durante 30 segundos, la mezcla obtenida se añade bajo protección de nitrógeno al medio nº1 preparado. La agitación se mantiene a temperatura ambiente durante 3 horas y la reacción se controla en HPLC. El medio de reacción se seca sin calentar a vacío. El residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice 60 (0,040-0,063 mm, Merck Cat. Nº. 109385) con el eluyente diclorometano/metanol, 5/1, v/v. se obtienen 85 mg de producto, lo que corresponde a un rendimiento de 40%. La pureza es de 96%, determinada por HPLC.

35 1.4. Etapa 3 : obtención del folato-C4-ácido

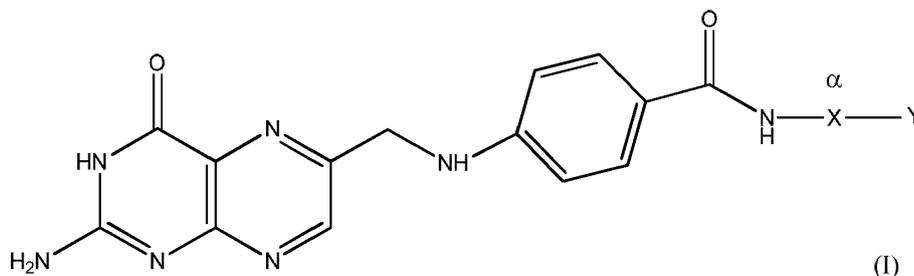
85 mg (0,168 mmoles) del ácido N-trifluoroacetil-folato-C4-Me preparado se mezclan con 6 mL de metanol. se añaden 2 mL de una solución de NaOH 1 N. La mezcla se agita a temperatura ambiente y al abrigo de la luz durante 16 horas. El medio de reacción se neutraliza a pH 2 con 50% de ácido trifluoroacético, después se seca a presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se lava con 10 mL de agua desmineralizada y se seca a vacío. se

obtienen 66 mg de folato-C4-ácido, lo que corresponde a un rendimiento de 98%. La pureza es de 97,2%, determinada por HPLC.

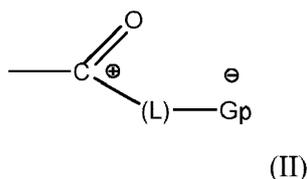
La síntesis del folato-C4-ácido se resume en la figura 1.

5 **Ejemplo 2: Preparación del ácido 6-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)hexanoico (folate-C6-ácido)**

El derivado de folato denominado « folato-C6-ácido » es un derivado según la presente invención que responde a la fórmula general (I) siguiente:



10 en la que X es una cadena hidrocarbonada alifática, lineal y saturada, que comprende 5 átomos de carbono, y en la que, Y es un grupo de tipo centro electrófilo, que responde a la fórmula general (II) siguiente:



en la que L está ausente y Gp es -OH.

15 El folato-C6-ácido (ácido 6-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metil-amino)benzamido)hexanoico) se sintetiza de forma análoga al folato-C4-ácido. En la etapa 2 ya mencionada, el brazo 4- metil 4-aminobutirato (NH₂-C₄-Me) es reemplazado por un brazo etil-6-aminocaproato (NH₂-C₆-Et, éster etílico del ácido amino 6-hexanoico). Este compuesto se prepara a partir del ácido amino-6-hexanoico en presencia de etanol y de cloruro de acetilo.

Se obtienen 60 mg de folato-C6-ácido a partir de 171 mg de ácido N-trifluoroacetilpteroico, lo que corresponde a un rendimiento global de 34%. La pureza es de 96%, determinada por HPLC.

La síntesis del folato-C6-ácido se resume en la figura 2.

20 De una manera general, se podrá hacer que varíe la longitud de la cadena hidrocarbonada X en el derivado de fórmula general (I) utilizando, en la etapa 2, los reactivos aminoalcanoato de alquilo cuya longitud de la parte hidrocarbonada del alcanoato varía (4 átomos de carbono para obtener el compuesto denominado « folato-C4-ácido »; 6 átomos de carbono para obtener el compuesto denominado « folato-C6-ácido »).

Ejemplo 3 : Preparación de los ésteres de folato-C4-NHS

25 Los reactivos N-hidroxisuccinimida (NHS, CAS-Nº. 6066-82-6), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, CAS-Nº. 538-75-0), dimetilsulfóxido (DMSO, CAS-Nr. 67-68-5) y tetrahidrofurano (CAS-Nr. 109-99-9) se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

30 66 mg (0,166 mmoles) de folato-C4-ácido obtenidos en el ejemplo 1, 28,8 mg (o bien 1,5 x 0,166 mmoles) de NHS y 4 mL de DMSO seco se introducen en un matraz. después de 2 minutos de agitación se introducen 41,1 mg (o bien 1,2 x0,166 mmoles) de DCC. La agitación se mantiene a temperatura ambiente al abrigo de la luz durante 48 horas. La HPLC se utiliza para controlar el avance de la activación. se añaden 7 mg de NHS y 4 mg de DCC y la agitación se mantiene durante 72 horas suplementarias.

35 La mezcla de reacción se filtra y la solución obtenida se mezcla con 5 mL de tetrahidrofurano seco, después se añaden 170 mL de diclorometano seco. Después de 15 minutos la mezcla se centrifuga sin agitación para recuperar el precipitado que se seca a continuación a presión reducida, sin calentar y al abrigo de la luz. Se obtienen 42 mg de folato-C4-NHS, lo que corresponde a un rendimiento de 51%. La pureza es de 69%, determinada por HPLC.

La obtención del éster de folato-C4-NHS se representa en la figura 1 (cf. última etapa de reacción).

Ejemplo 4 : Preparación de los ésteres de folato-C6-NHS

Como para el éster de folato-C4-NHS, los reactivos utilizados son los siguientes: N-hidroxisuccinimida (NHS, CAS-Nº. 6066-82-6), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, CAS-Nº. 538-75-0), dimetilsulfóxido (DMSO, CAS-Nº. 67-68-5) y tetrahidrofurano (CAS-Nº. 109-99-9), y se obtuvieron en Sigma-Aldrich.

- 5 60 mg (0,14 mmoles) de folato-C6 ácido obtenido en el ejemplo 2, una mezcla de disolventes secos DMF (2,5 mL) y DMSO (3 mL) y 17,7mg (1,1 x 0,14 mmoles) de NHS se introducen en un matraz. Después de 2 minutos de agitación se añaden 32 mg (1,1 x 0,14 mmoles) de DCC. La agitación se mantiene a temperatura ambiente al abrigo de la luz durante 24 horas. La HPLC se utiliza para controlar el avance de la activación. Se añaden 30 mg de NHS y 30 mg de DCC y la agitación se mantiene durante 96 horas suplementarias.
- 10 El medio de reacción se centrifuga durante 3 minutos a 3000 revoluciones/min y el líquido recuperado se mezcla con 30 mL de la mezcla de disolventes diclorometano/éter de petróleo (1/1), después se centrifuga de nuevo para obtener un precipitado amarillo. El producto se seca a presión reducida, sin calefacción y al abrigo de la luz. Se obtienen 21 mg (rendimiento 29%) de folato-C6-NHS con una pureza HPLC de 83,1%.

La síntesis del éster de folato-C6-NHS se resume en la figura 2 (cf. última etapa de reacción).

15 Ejemplo 5: Preparación de los conjugados de folato-C4-NHS-fosfatasa alcalina y folato-C6-NHS-fosfatasa alcalina

- 20 0,5 mL de una solución de fosfatasa alcalina (PAL) recombinante de 20 mg/mL (Roche, ref. 03-535-452), se dializan en tubo Spectra/Por® (umbral de corte 6000-8000 Da, Spectrum Laboratories, USA) frente a 500 mL de tampón carbonato 100 mM pH 8,3, bajo agitación magnética durante una noche, a +2/8°C. A la salida de la diálisis la concentración de la proteína se determina por lectura de la densidad óptica a 280 nm y esta concentración se ajusta a 4 mg/mL.

Los ésteres activados de folato-C4-NHS y folato-C6-NHS obtenidos en el ejemplo 2 se recogen en DMSO a concentraciones de 0,39 mg/mL y de 0,5 mg/mL respectivamente, teniendo en cuenta la pureza.

- 25 Para un acoplamiento de tipo (1-5) (1 mol de fosfatasa alcalina-5 moles de éster de folato), 1,125 mL de la solución de PAL se mezclan con 256 µL de la solución de éster folato-C4-NHS de una parte y 255 µL de la solución de éster folato-C6-NHS de otra parte. El porcentaje de DMSO en el medio de reacción es de 18,5%. Las mezclas se incuban durante una noche a +2/8°C, en agitación sobre una rueda, en frascos marrones.

- 30 A continuación, la reacción se bloquea por adición de lisina 10 mM diluida en agua. La cantidad de lisina añadida es equimolar a la cantidad de éster utilizada para el acoplamiento. Se añaden por lo tanto 20,5 µL de la solución de lisina para cada uno de los acoplamientos. Las mezclas se incuban durante 20 minutos sobre una rueda a +18/25°C.

Después de detener la reacción, 1 mL de cada uno de los conjugados se dializa en tubo Spectra/Por® (umbral de corte aproximadamente 7000 Da) durante 3h a +18/25°C frente a 500 mL de tampón Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/L, azida 0,9 g/L, bajo agitación magnética. Al cabo de 3 horas, los tubos se transfieren a nuevos baños que contienen siempre 500 mL del mismo tampón. La diálisis se continúa durante la noche a +2/8°C, bajo agitación magnética.

- 35 Al final de la diálisis, a los volúmenes recuperados de los tubos se añade tampón de conservación 10x (Tris 500 mM pH 7,4, NaCl 90 g/L, MgCl₂ 50 mM, ZnCl₂ 1 mM, SDS 0,01%, azida 9 g/L. El volumen obtenido es aproximadamente 1 mL por conjugado. A continuación de la diálisis, los conjugados no están más que semipurificados: La diálisis permite eliminar el folato libre que no ha reaccionado, pero no la fosfatasa alcalina libre. Los conjugados se pueden utilizar en una inmunosofización en este estado, y esto es lo que se ha hecho en el ejemplo 6 infra.

- 40 Para eliminar la PAL libre y obtener así conjugados con una mejor pureza, se realizó la cromatografía de interacciones hidrófugas utilizando una columna RESOURCE Phenyl (Cat Nº. 17-1186-01, GE Healthcare Lifesciences) montada sobre una cadena de cromatografía ÄKTA. El caudal de la bomba está regulado en 2 mL/min. El tampón TA es Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/L, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, azida 0,9 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,6 M. El tampón TB es Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/L, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, azida 0,9 g/L. La columna RESOURCE Phenyl está equilibrada en tampón TA. El conjugado a purificar se mezcla volumen por volumen con el tampón
- 45 tampón TB. Después, se añaden 2 volúmenes del tampón Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 9 g/L, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, azida 0,9 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3,2 M. Esta etapa permite tener el conjugado en el tampón TA. La inyección del conjugado (628 µL para el folato-C4-NHS-PAL y 560 µL para el folato-C6-NHS-PAL, sobre un bucle de 5 mL) va seguido de un lavado de 20 mL en tampón TA. A continuación, se aplica un gradiente de 0 a 57% de TB durante 30
- 50 mL, después un lavado en 57% de tampón TB durante 20 mL. Esta etapa va seguida por un segundo gradiente de 57 a 100% de TB aplicado durante 30 mL, después por un lavado en tampón TB durante 20 mL. La última etapa consiste en un gradiente de 0 a 100% en agua durante 20 mL, y después un lavado en agua durante 20 mL. El desarrollo de la cromatografía se observa por medición de la densidad óptica a 280 nm. Las fracciones a partir de 74 mL de elución hasta 104 mL (o bien en total 30 mL) se recuperan, se reúnen y después se concentran por diafiltración utilizando una célula Amicon (Amicon stirred cells, Millipore), una membrana Amicon PM con un umbral de corte de 10 000 Da y el tampón TB. Después de esta etapa, el volumen de la solución de conjugado se ha
- 55

reducido a aproximadamente 0,5 mL. Los conjugados se conservan a +2/8°C hasta su utilización en una inmunodosificación.

Ejemplo 6: Dosificación de la vitamina B9 utilizando los conjugados folato-C4-NHS-fosfatasa alcalina y folato-C6-NHS-fosfatasa alcalina y comparación con el conjugado de la dosificación Axsym (Abbott Laboratories)

Las dosificaciones inmunológicas se realizaron utilizando el autómatas de inmunoanálisis VIDAS® (bioMérieux). El cono de único uso sirve a la vez de fase sólida para la reacción y de sistema de pipeteado. El cartucho se compone de 10 pocillos recubiertos con una lámina de aluminio sellada y etiquetada. El primer pocillo comprende una parte recortada previamente para facilitar la introducción de la muestra. El último pocillo es una cubeta óptica en la que se mide la fluorescencia del sustrato. Los diferentes reactivos necesarios para el análisis están contenidos en los pocillos intermedios.

a) Sensibilización y pasivación de los conos

Los conos se sensibilizaron con 300 µL de un anticuerpo monoclonal de ratón « anti-folate binding protein » (clon P8C5E4, bioMérieux) diluido a 5 µg/mL en un tampón Tris 0,2 M, pH 6,2. Después de 6 horas de incubación a +18/25°C, se efectúa un lavado con una solución de NaCl 1 M. A continuación se añaden 300 µL de una solución de « folate binding protein » (FBP, Cat. Nº. F0524, Scripps Laboratories) diluida a 6 ng/mL en un tampón fosfato 100 mM, pH 7,4 NaCl 0,15 M que contiene albúmina humana y un azúcar. La sensibilización / pasivación se prosigue a +18/25°C durante la noche. Los conos se vacían, se secan y después se conservan a +4°C hasta su utilización.

b) Preparación de una gama a partir de muestras biológicas

Muestras de suero humano que contienen diferentes concentraciones de folato se obtuvieron después a partir del laboratorio Biomnis (Lyon, Francia). Las muestras que tenían las mismas concentraciones se mezclaron con el fin de aumentar el volumen disponible por punto de gama. Las mezclas se distribuyeron en partes alícuotas de 120 µL y se congelaron -20°C hasta su utilización. Las concentraciones nominales de cada uno de los puntos son: 1,3 ng/mL - 4,4 ng/mL - 10 ng/mL - 20 ng/mL. El punto de gama 0 ng/mL se preparó en disolvente 10% de albúmina sérica humana en tampón fosfato borato 10 mM pH 8,5, 0,15 M NaCl.

c) Extracción de las muestras

El objetivo de la etapa de extracción es disociar el folato sérico de sus partícipes de unión y hacerlo accesible para la dosificación. A 250 µL de muestra se añaden 50 µL de una solución de TCEP de 62,5 mg/mL (tris(2-carboxietil)fosfina) y 250 µL de una solución de NaOH 0,8N+KCN 0,005%. La mezcla se incubó a +18/25°C durante 15 minutos, al abrigo de la luz. Después de esta etapa, se añade 1 mL de tampón glicina 1M pH4.

d) Modo operativo de la reacción de inmunodosificación

La muestra a dosificar (200 µL), extraída según el protocolo descrito en c), se introduce en el primer pocillo del cartucho. A continuación todas las etapas de la reacción de dosificación se realizan automáticamente por el VIDAS®. Los conos preparados según el protocolo descrito en a) se humedecen con un tampón glicina 1 M pH 10, NaCl 0,1 M y sacarosa 2%. La muestra a dosificar se mezcla con 200 µL de una solución de conjugado, que es un derivado de folato marcado con la fosfatasa alcalina. La mezcla muestra/conjugado se incubó en el cono durante aproximadamente 20 minutos, durante los cuales se efectúa una competición entre los folatos presentes en la muestra y el derivado de folato del conjugado frente a sitios de la proteína FBP presentada sobre el cono. A continuación, se efectúan 3 lavados sucesivos con un tampón Tris 100 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tween® 20 0,1% con el fin de eliminar los compuestos no fijados. Durante la etapa final de revelado, se aspira el sustrato 4-metilumbeliferil fosfato y después se vierte en el cono; la enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en 4-metilumbeliferona cuya fluorescencia se mide a 450 nm. El valor de la señal fluorescente es inversamente proporcional a la concentración de folato presente en la muestra.

En el ensayo presentado en la tabla 1 se compararon tres conjugados. Se trata de dos conjugados obtenidos en el ejemplo 3 y, como referencia, el conjugado utilizado en el kit Abbott Axsym Folate (Cat. Nº. B7K460, Abbott Laboratories).

- (i) los conjugados folato-C4-PAL y folato-C6-PAL se diluyeron a una concentración entre 0,50 - 0,75 ng/mL en el tampón diluyente conjugado que contiene 100 mM de Tris pH 8,5, 0,15 M NaCl, 20 mg/L de IgG de ratón, agentes estabilizantes, agentes conservantes y otros aditivos.
- (ii) el conjugado del kit Axsym folato es un conjugado de ácido pterico (análogo de folato) y de fosfatasa alcalina. Este conjugado se diluyó a 1/80 de tampón diluyente conjugado antes de su utilización en el VIDAS®.

Los puntos de gama preparados en b) se midieron con cada formato de dosificación. La Tabla 1 inferior resume los resultados obtenidos en señal RFV (= relative fluorescence value) y relación B/B0%. La relación B/B0% es la señal

obtenida para el punto de gama ensayado dividida por la señal obtenida para el punto de gama 0 ng/mL de folato, multiplicada por 100.

Tabla 1

[c] folato (ng/mL)	REF = conjugado Axsym		Folato-C4-PAL		Folato-C6-PAL	
	Señal (RFV)	B/B0%	Señal (RFV)	B/B0%	Señal (RFV)	B/B0%
0	3399	100	3544	100	4118	100
1,3	3329	98	3095	87	3563	87
4,4	2442	72	2016	57	2619	64
10	925	27	995	28	1131	27
20	39	1	24	1	34	1

- 5 Se observa una disminución de la señal de 87% a partir de 1,3 ng/mL de folate con los conjugados folato-C4-PAL y folato-C6-PAL de la invención, mientras que con el conjugado de referencia apenas comienza la disminución de la señal.

10 Por consiguiente, las dosificaciones que utilizan los conjugados folato-C4-PAL y folato-C6-PAL son más sensibles que la dosificación que utiliza el conjugado de referencia, y permiten una mejor detección y cuantificación de las concentraciones inferiores a 4,4 ng/mL, e incluso inferiores a 1,3 ng/mL.

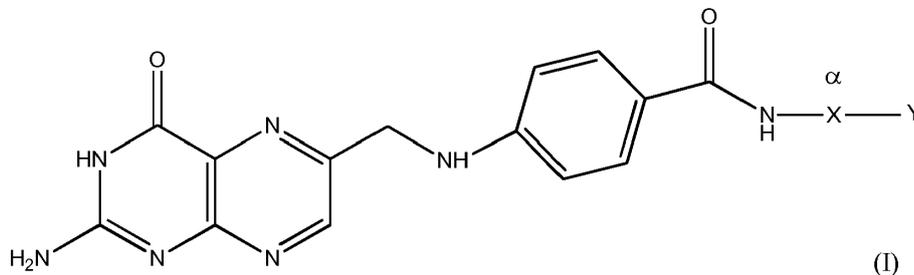
15 En lo que concierne a los derivados y conjugados de folato según la invención, en particular a los que responden a las fórmulas generales (I), (I'), (III), (III'), (III''), (VI), (VI'), (VIII) y (IX) antes mencionadas, conviene advertir que incluso la parte pterina de estos está representada esquemáticamente en su forma cetona, la presente invención cubre bien evidentemente todas las - y cada una de las - formas tautómeras de dichos derivados y conjugados de folato capaces de ser obtenidos a nivel de dicha parte pterina y, en particular la forma 2-amino-4-hidroxi-6-metilpterina.

Referencias bibliográficas

1. Antony AC, The biological chemistry of folate receptors, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Blood. 1 de junio de 1992; 79(11):2807-20
- 20 2. Reif VD, Reamer JT, Grady LT., Chromatic assays for folie acid, J Pharm Sci. 1977 agosto;66(8):1112-6 PMID:894496
3. Dueker SR, Lin Y, Jones AD, Mercer R, Fabbro E, Miller JW, Green R, Clifford AJ., Determination of blood folate using acid extraction and internally standardized gas chromatography-mass spectrometry detection, Anal Biochem. 2000 agosto 1;283(2):266-75 PMID:10906248
- 25 4. Pfeiffer CM, Fazili Z, McCoy L, Zhang M, Gunter EW, Détermination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologie assay, Clin Chem. 2004 feb;50(2):423-32. Epub 2003 dic. 11 PMID:14670827
5. Waxman S. et Schreiber C., Détermination of folate by use of radioactive folate and binding proteins, Methods Enzymol. 1980; 66:468-83. No obtenible en resumen. PMID:7374487
- 30 6. Hansen, S. I. et Holm, J., A competitive enzyme-linked ligand sorbent assay (ELLSA) for quantitation of folates, Anal Biochem. 1988 Jul;172(1):160-4. PMID:3189760
7. Owen, W.E. et Roberts, W. L., Comparison of five automated serum and whole blood folate assays, Am J Clin Pathol. 2003 julio;120(1):121-6. PMID:12866382
- 35 8. Arcot J. et Shrestha A., Folate: methods of analysis, Food Science and Technology, School of Chemical Engineering and Industrial Chemistry, The University of New South Wales, Sydney, Australia, 2005

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un derivado de folato para dosificar el (los) folato(s) *in vitro* en una muestra tal como una muestra biológica, siendo dicha dosificación una inmunodosificación por competición no radio-isotópica, y dicho derivado de folato responde a la fórmula general (I) :



en la que:

- X es una cadena hidrocarbonada alifática que contiene 1 a 10 átomos de carbono, no conteniendo dicha cadena hidrocarbonada alifática más que hidrógeno y carbono; y

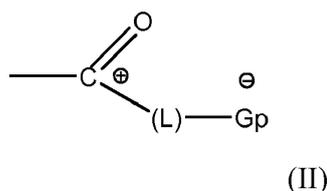
10 - Y representa un grupo funcional adaptado para permitir el acoplamiento con una molécula distinta M, tal como una proteína, comprendiendo dicho acoplamiento la formación de al menos una unión covalente entre Y y un grupo funcional portado por dicha molécula distinta M, siendo Y un grupo de tipo centro electrófilo o un grupo de tipo centro nucleófilo, de preferencia un grupo de tipo centro electrófilo, adaptado para permitir la formación de una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre Y y el grupo funcional portado por dicha molécula distinta M.

15 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que X es una cadena hidrocarbonada que contiene 2 a 7 átomos de carbono, de preferencia 3 a 5 átomos de carbono, ventajosamente X es una cadena hidrocarbonada de 3 átomos de carbono o de 5 átomos de carbono.

3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que X es una cadena hidrocarbonada saturada.

4. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que X es una cadena hidrocarbonada lineal.

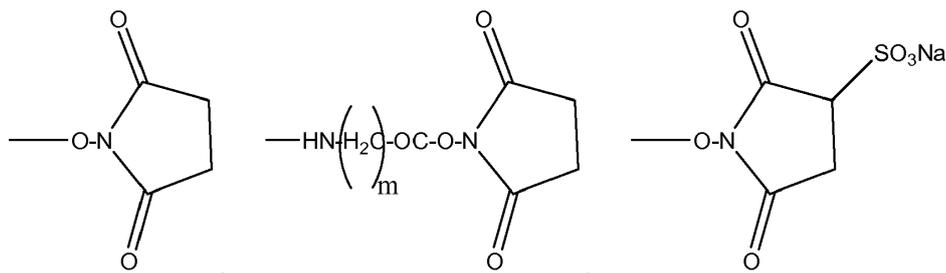
20 5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que Y es un grupo de tipo centro electrófilo, que responde a la fórmula general (II) siguiente:

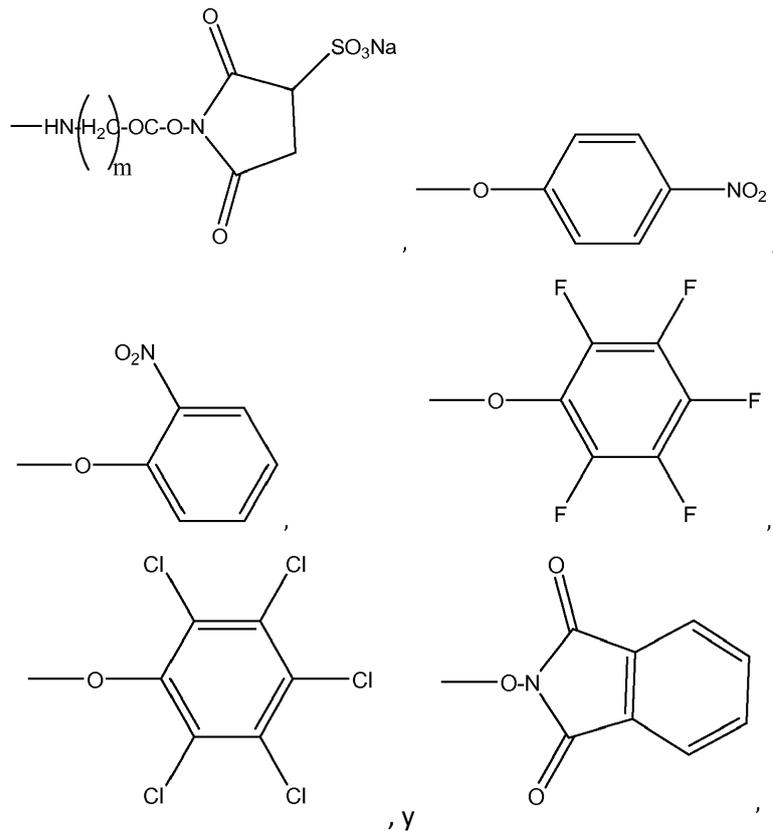


25 en la que Gp es un grupo lábil, eventualmente unido a la función carbonilo por un brazo L, estando Gp adaptado para ser disociado del grupo de tipo centro electrófilo durante una reacción con un grupo nucleófilo portado por dicha molécula distinta M, tal como una amina primaria.

6. Utilización según la reivindicación 5, en la que el grupo (L)-Gp se elige entre los grupos adaptados para permitir la formación de una unión amida, éster o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre dicho grupo de tipo centro electrófilo y un grupo funcional portado por dicha molécula distinta M.

7. Utilización según la reivindicación 5 o 6, en la que el grupo (L)-Gp se elige entre: -OH, -NH-(CH₂)_m-COOH, -N₃,



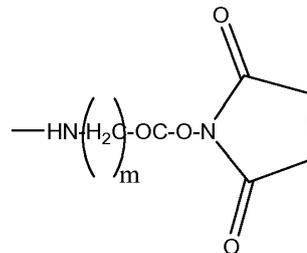


m es un número entero comprendido entre 1 y 10.

5 **8.** Utilización según la reivindicación 7, en la que m está comprendido entre 1 y 5, ventajosamente entre 1 y 3.

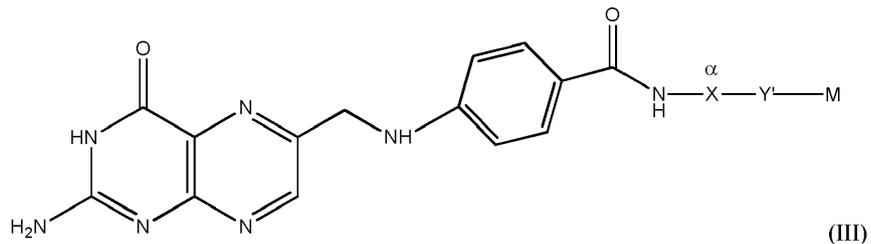
9. Utilización según una de las reivindicaciones 5 a 8, en la que el grupo (L)-Gp se elige entre:

-OH y -NH-(CH₂)_m-COOH y



m está comprendido entre 1 y 10, y de preferencia m es igual a 1.

10 **10.** Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el derivado de fórmula general (I) se utiliza en forma de conjugado con dicha molécula M, y estando representado dicho conjugado por la fórmula general (III) siguiente:

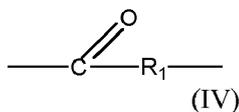


(III)

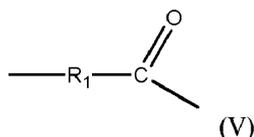
15 en la que X y M son tal como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 9, y en la que Y' es un derivado del grupo funcional Y después del acoplamiento del derivado de fórmula general (I) con dicha molécula M,

siendo preferentemente dicha molécula M una molécula marcadora Mm.

11. Utilización según la reivindicación 10, en la que Y' se representa por la fórmula general (IV) siguiente:



o por la fórmula general (V) siguiente:



5

en las cuales R1 es -NH-, -O-, ó -S-, de preferencia -NH- u -O-, ventajosamente -NH- ;

de preferencia Y' está representada por la fórmula general (IV).

12. Procedimiento de dosificación *in vitro* del (de los) folato(s) en una muestra tal como una muestra biológica, siendo dicha dosificación una inmunodosificación por competición no radio-isotópica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

10

a) poner en presencia, en el seno de dicha muestra biológica, (i) al menos un partícipe de unión del/ de los folato(s), tal como un anticuerpo adaptado para unirse al/ a los folato(s) o tal como el receptor de los folatos, con (ii) al menos un compuesto elegido entre un derivado de folato tal como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 9 y un conjugado como el definido en la reivindicación 10 o 11, estando adaptado al menos uno de dichos compuestos (i) e (ii) para emitir una señal,

15

b) eventualmente dejar un plazo de tiempo suficiente para permitir la reacción de competición,

c) medir la intensidad de la señal y deducir de ella la concentración de folato(s) presente en dicha muestra biológica en relación a una curva de calibración que establece una relación entre intensidad de la señal medida y concentración de folato(s).

13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el compuesto (ii) es un conjugado tal como el definido en la reivindicación 10 u 11.

20

14. Método diagnóstico *in vitro* con objeto de determinar si un paciente humano o animal, de preferencia humano, presenta una carencia de folate(s), comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

a) en el seno de una muestra biológica, de preferencia sangre entera, plasma o suero, extraída a partir de dicho paciente, dosificar el (los) folato(s) utilizando el procedimiento de dosificación *in vitro* según la reivindicación 12 o 13, con el fin de deducir la concentración de folato(s) en la muestra biológica

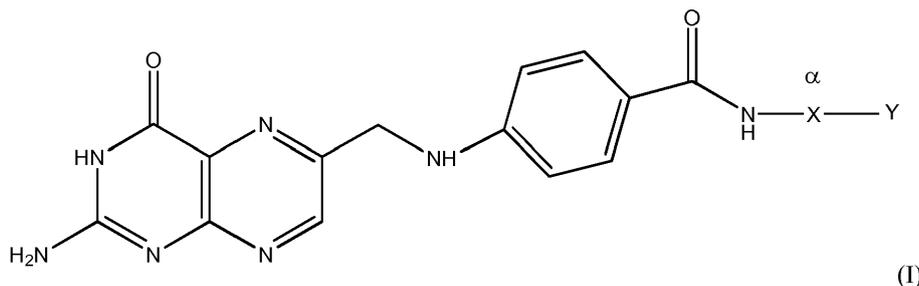
25

b) comparar dicha concentración con un valor umbral, que corresponde a una concentración determinada de folato(s) por debajo de la cual un paciente se considera carente de folato(s), y

c) si la concentración dosificada es inferior a dicho valor umbral, deducir que el paciente presenta una carencia de folato(s).

30

15. Derivado de folato de fórmula general (I), adaptado para ser utilizado en una inmunodosificación por competición no radio-isotópica:



en la que:

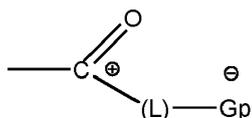
- X es tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 9;

- Y es un grupo de tipo centro electrófilo o de tipo centro nucleófilo, de preferencia un grupo de tipo centro electrófilo, adaptado para permitir la formación de una unión amida, éster, o tioéster, de preferencia amida o éster, ventajosamente amida, entre Y y un grupo funcional portado por una molécula distinta M, y en la que:

5 - cuando X es una cadena hidrocarbonada lineal y saturada que contiene un número de átomos de carbono igual a 2, Y no es un grupo $-(O-CH_2-CH_2)_2-NH_2$;

- cuando Y es un grupo de tipo centro nucleófilo que consiste en una amina primaria, X comprende un número de átomos de carbono diferente de 6,

- cuando Y es un grupo de tipo centro electrófilo, este último responde a la fórmula general (II) siguiente:

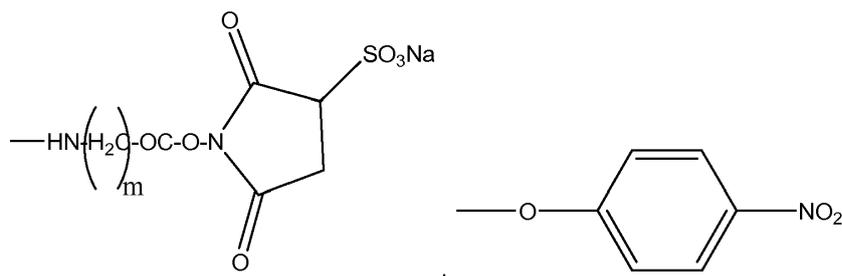
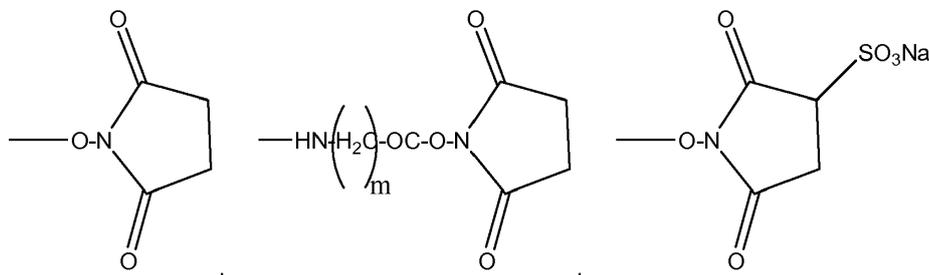


(II)

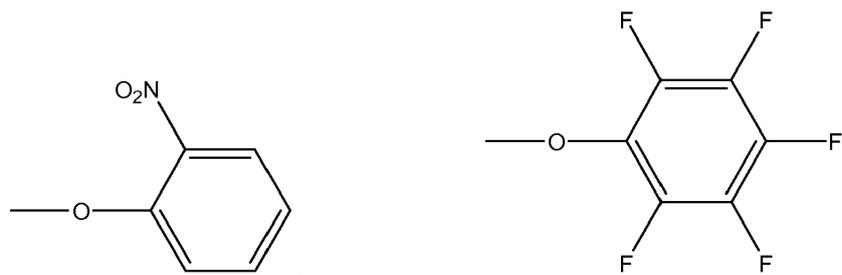
10 en la que Gp es un grupo lábil, eventualmente unido a la función carbonilo por un brazo L, estando adaptado Gp para ser dissociado del grupo de tipo centro electrófilo durante una reacción con un grupo nucleófilo portado por dicha molécula distinta M, tal como una amina primaria, y en el cual, cuando L está ausente y Gp es $-OH$, X comprende un número de átomos de carbono superior a 4.

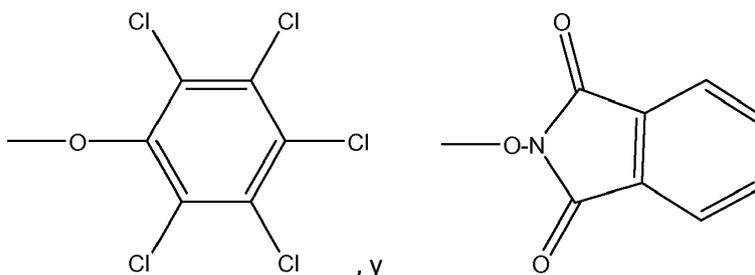
15 **16.** Derivado de folato según la reivindicación 15, en el cual Y es un grupo de tipo centro nucleófilo que consiste en un grupo funcional diferente de una amina primaria.

17. Derivado de folato según la reivindicación 15, en el cual Y es un grupo de tipo centro electrófilo que responde a la fórmula general (II) y en la que (L)-Gp es un grupo lábil elegido entre: $-OH$, $-NH-(CH_2)_m-COOH$, $-N_3$,



20

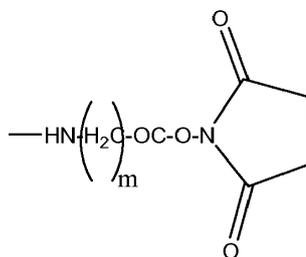




siendo m un número entero comprendido entre 1 y 10, de preferencia comprendido entre 1 et 5, ventajosamente comprendido entre 1 y 3, en el cual cuando L está ausente y Gp es -OH, X comprende un número de átomos de carbono superior a 4.

5 **18.** Derivado de folato según la reivindicación 17, en el cual (L)-Gp se elige entre:

-OH y -NH-(CH₂)_m-COOH y



estando comprendido m entre 1 y 10 y de preferencia m es igual a 1,

10 en el cual, cuando L está ausente y Gp es -OH, X comprende un número de átomos de carbono superior a 4.

19. Derivado de folato según una de las reivindicaciones 15, 17 o 18, en el cual Gp es un grupo diferente de un grupo -OH.

15 **20.** Conjugado que comprende un derivado de folato según una de las reivindicaciones 15 a 19 y una molécula distinta M, estando unidos dicho derivado y dicha molécula M por al menos una unión amida, éster o tioéster, de preferencia una unión amida o éster, ventajosamente por una unión amida, entre Y y un grupo funcional portado por dicha molécula M.

21. Conjugado según la reivindicación 20, en el cual dicha molécula M es una molécula marcadora M_m que permite el marcado directo o indirecto de dicho derivado de folato.

22. Kit que permite la realización del procedimiento según la reivindicación 12 o 13, comprendiendo dicho kit:

- 20
- (i) al menos un partícipe de unión del (de los) folato(s) tal como un anticuerpo adaptado para unirse al/a los folato(s) o tal como el receptor de folatos,
 - (ii) al menos un compuesto elegido entre un derivado de folato tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 a 9 y un conjugado tal como el definido en la reivindicación 10 u 11,

estando adaptado al menos uno de dichos compuestos (i) e (ii) para emitir una señal, y

25 - al menos un medio de calibración.

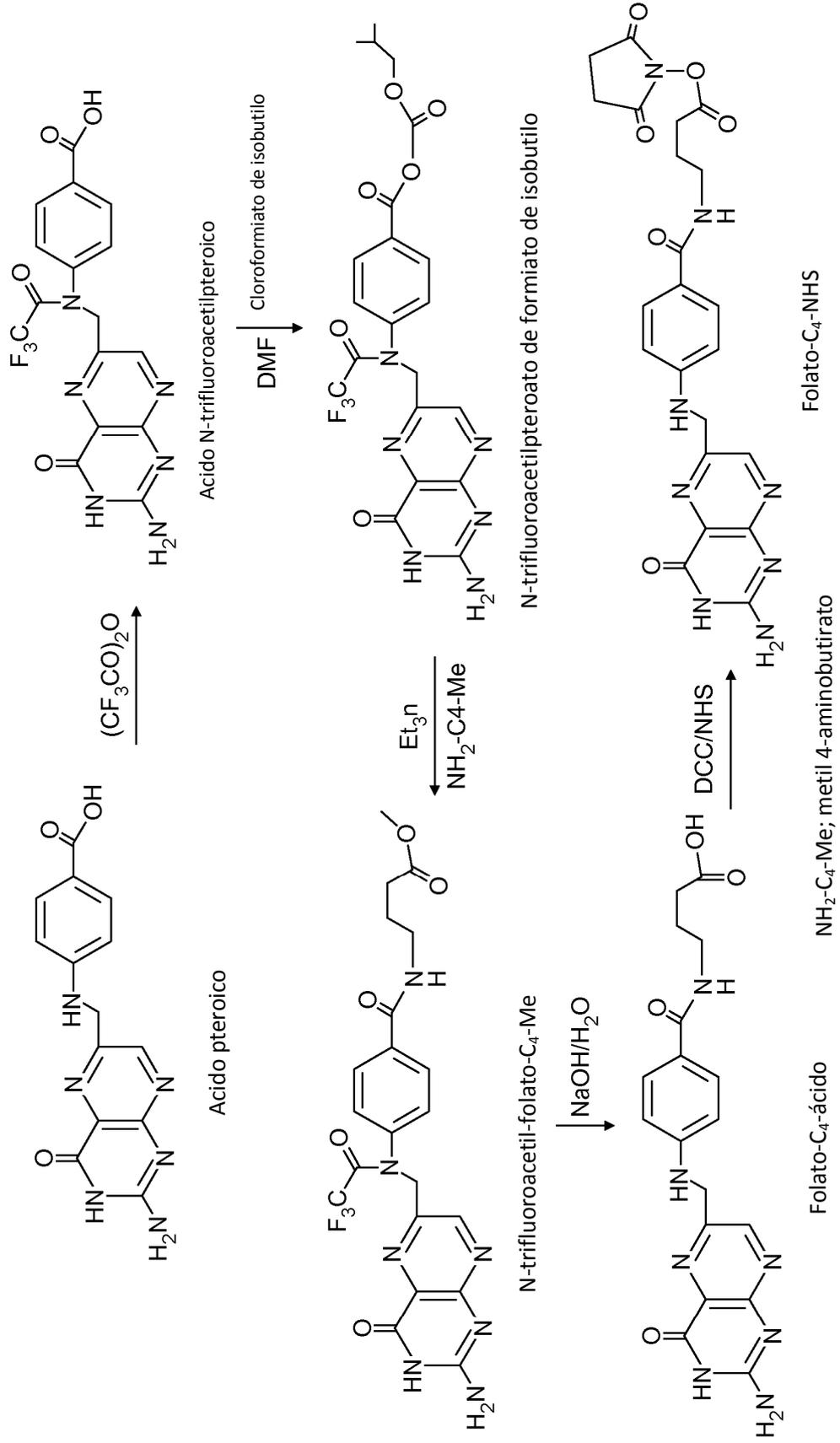


FIG. 1

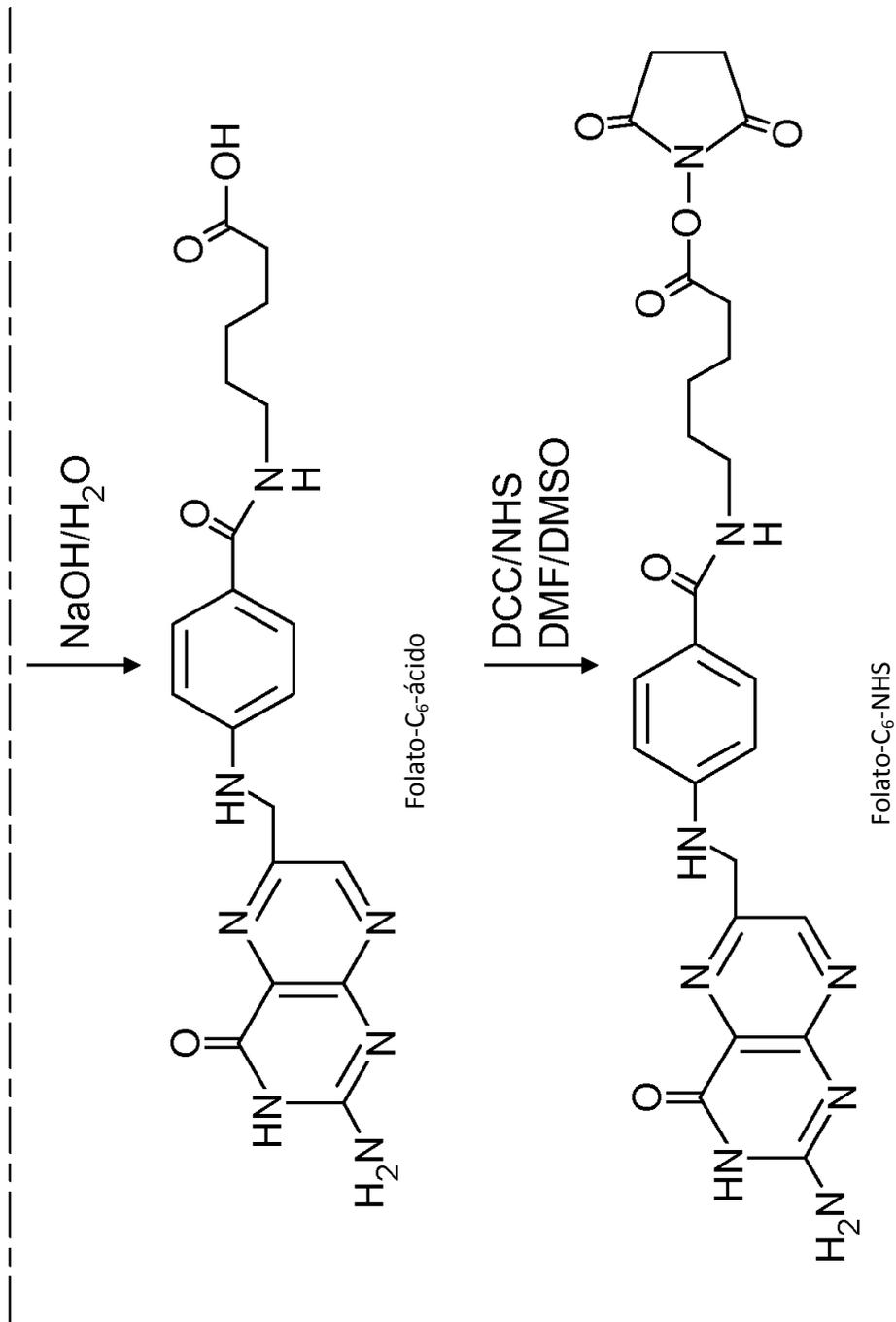


FIG. 2 continuación