

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 260**

21 Número de solicitud: 201731332

51 Int. Cl.:

**A61K 51/04** (2006.01)

**C07F 13/00** (2006.01)

**C07K 14/765** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**16.11.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.05.2019**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)**  
**Plaza de Santa Cruz, 5 bajo**  
**47002 Valladolid ES**

72 Inventor/es:

**ÁLVAREZ MIGUEL, Lucía;**  
**BARBERO SAN JUAN, Héctor;**  
**GARCÍA RODRÍGUEZ, Raúl;**  
**ÁLVAREZ GONZÁLEZ, Celedonio Manuel;**  
**MIGUEL SAN JOSÉ, Daniel y**  
**MARTÍN ALVAREZ, José Miguel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **PROTEÍNAS FUNCIONALIZADAS, MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN Y APLICACIÓN EN DETECCIÓN POR INFRARROJO**

57 Resumen:

Proteínas funcionalizadas, método para su obtención y aplicación en detección por infrarrojo.

La presente invención describe una novedosa metodología de funcionalización de proteínas mediante la incorporación de un fragmento metálico de Renio con alto rendimiento, dando lugar a iminopiridinas coordinadas que poseen tres grupos carbonilo en posición fac- que ofrecen bandas procedentes de la tensión del enlace CO en el espectro de infrarrojo (IR) en una zona donde las proteínas no muestran señal alguna, lo que permite una aplicación muy interesante desde el punto de vista de detección de moléculas de interés biológico.

ES 2 713 260 A1

**DESCRIPCIÓN****PROTEÍNAS FUNCIONALIZADAS, MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN Y APLICACIÓN EN DETECCIÓN POR INFRARROJO**

5

La presente invención se encuadra dentro del campo de la bioinorgánica y se refiere a un nuevo método de funcionalización de proteínas a través de la incorporación de un fragmento metálico que contiene grupos carbonilos susceptibles de ser observados por espectroscopía de infrarrojo (IR).

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

La química bioinorgánica es un campo de la química inorgánica de creciente interés científico, sobre todo en relación al estudio de complejos proteína-fragmento metálico en los que existe al menos un enlace covalente que une la biomolécula y el grupo prostético. Dicho fragmento metálico puede ofrecer información de la proteína (por ejemplo, su ubicación espacial en una muestra biológica) por medio de diversas técnicas espectroscópicas. En este contexto, el metal Renio ocupa un lugar importante, muy probablemente debido a su posible utilidad como radiofármaco o con aplicaciones para bioimagen. Sin embargo, todos los estudios realizados hasta la fecha usan complejos *fac*-triacuo (o precursores de los mismos) y la carga metálica se obtiene fundamentalmente por coordinación del grupo imidazol de la cadena lateral del aminoácido histidina (ver Ziegler, C. J.; Herrick, R. S.; Rowlett, R. S. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 1203-1205) La carga metálica obtenida en los casos expuestos es muy baja.

20

25

Además, si se desea usar el fragmento metálico como un sensor observable por espectroscopía de emisión UV-Visible, es necesario un paso de post-funcionalización para unir un ligando cromóforo al metal.

30

35

Otra posibilidad reside en la funcionalización de la proteína a través de reacciones en los ligandos que forman parte de la primera esfera de coordinación del metal que se encuentren activados por el mismo. Así, un buen ejemplo lo constituye la reacción de Schiff entre una amina primaria y un aldehído coordinado, como puede ser el 2-piridincarboxaldehído. Existen estudios en los que se puede demostrar que es posible unir una biomolécula (péptidos) a un fragmento *fac*-tricarboxilo de Renio que contiene el ligando 2-piridincarboxaldehído dando lugar a las iminopiridinas correspondientes

(ver Álvarez, C. M.; García-Rodríguez, R.; Miguel, D. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 2984-2996).

De los trabajos anteriormente mencionados se puede extraer que el grupo aldehído reacciona exclusivamente con aminas primarias no desactivadas, nunca con aminas secundarias o grupos amida. El único aminoácido cuyo grupo amino terminal cumple estas características, dentro del grupo de los aminoácidos que forman parte de las proteínas naturales, es el de la Lisina.

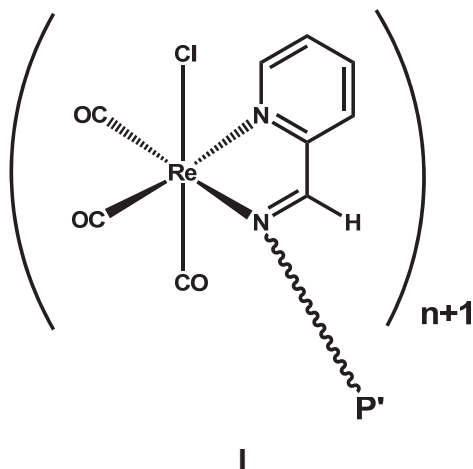
## 10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe dos métodos por los que es posible cargar una proteína (funcionalizarla) con un fragmento de Renio con alto rendimiento, donde la proteína ha de poseer aminoácidos Lisina en su estructura. Ambos métodos mejoran notablemente la capacidad de carga metálica en una proteína frente al estado actual de la técnica. Uno se realiza en condiciones lo suficientemente suaves como para no desnaturalizar la biomolécula, y otro en condiciones más enérgicas para alcanzar un máximo de carga metálica prácticamente completo.

El fragmento de Renio seleccionado es el fragmento metálico *fac*-tricarbonilo de Renio, ya que la existencia de los ligando CO proporcionan señales claras y definitorias en infrarrojo de la existencia del complejo de coordinación en la proteína. Los ligandos CO anteriormente comentados ofrecen señales muy agudas precisamente en la zona comprendida entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  y  $2500\text{ cm}^{-1}$  en un espectro de absorción de infrarrojo (IR), que siempre está vacía en una proteína. Esto constituye un avance notable en la detección de proteínas funcionalizadas por infrarrojo (IR) debido a las ventajas sobre otras técnicas (barata, rápida, fácil disponibilidad, raramente se pierde señal por cambios estructurales en el entorno del complejo de coordinación, etc.). Además, de esta manera se evitan pasos posteriores de post-funcionalización ya que el fragmento metálico incorporado a la proteína ya posee los ligandos adecuados que actúan de sensores.

Estos dos métodos de funcionalización de proteínas con el complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  se realizan a través de la reacción de Schiff entre el ligando 2-piridincarboxaldehído y al menos un grupo amino de los aminoácidos Lisina que se

encuentran en la correspondiente proteína, junto con el grupo amino terminal de la misma, proporcionan iminopiridinas de Fórmula I



5

donde P' es la proteína modificada como resultado de dicha reacción; y n es un número entero de entre 1 y el número de lisinas contenidas en la proteína de partida.

10

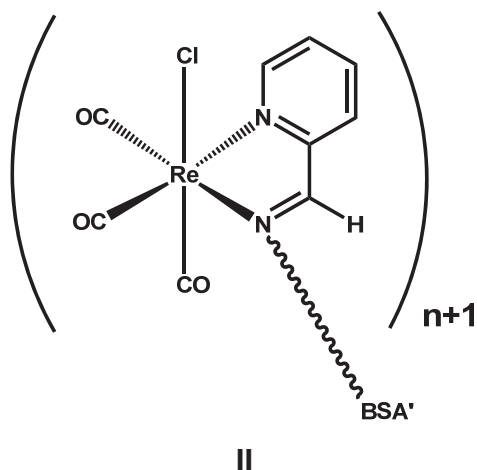
En un ejemplo de realización, estos métodos se llevan a cabo empleando la proteína de partida es albúmina de suero bovino (BSA). Se ha seleccionado esta proteína por ser de fácil acceso ya que pertenece al grupo más abundante de las proteínas plasmáticas y procede de los desechos de la industria ganadera. Posee en su estructura 60 Lisinas que, añadiendo el grupo amino terminal de la proteína, hacen un total de 61 grupos susceptibles de reaccionar con el complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$ .

15

Según ambos modos de realización preferente, se combinan dicho complejo metálico con la proteína en proporción 61 a 1, respectivamente.

20

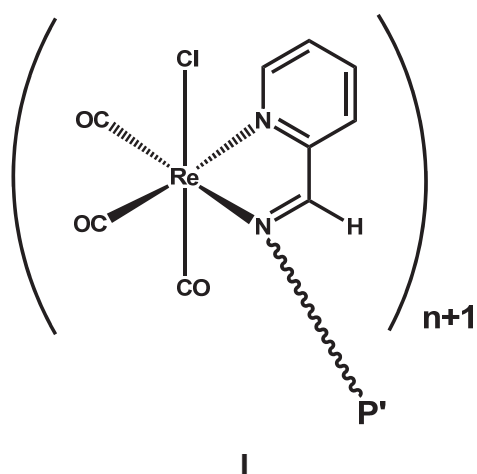
El resultado de la funcionalización de esta proteína con el complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  a través de la reacción de Schiff entre el ligando 2-piridincarboxaldehído coordinado al Renio y al menos un grupo amino de la albúmina de suero bovino (BSA) es un compuesto de fórmula II.



donde n es un valor de entre 1 y 60, y BSA' es la proteína albúmina de suero bovino  
5 modificada tras la reacción de Schiff.

Es interesante destacar la aplicabilidad de esta reacción para otras proteínas de  
interés desde un punto de vista biomédico, como por ejemplo fosfoinositida-3-quinasa  
(PI3K), proteína quinasa B (PKB), diana de rapamicina en células de mamífero  
10 complejo 1 (mTORC1), proteína 9 de unión al retinoblastoma (RBBP9), factor Inducible  
por Hipoxia-1 (HIF-1), acetilcolinesterasa (ACHE), receptores de N-metil-D-aspartato  
(NMDA), beta-secretasa 1 (BACE1), y alpha-secretasas, que participan en procesos  
cancerígenos y en enfermedades como el Alzheimer.

15 En un primer aspecto, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula I



20 caracterizado por que P' es una proteína modificada como resultado de la reacción de

Schiff entre al menos un grupo amino de la proteína de partida y el ligando 2-piridincarboxaldehído (pyca) del complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$ , donde la proteína de partida comprende al menos una lisina; y n es un número entero de entre 1 y el número de lisinas contenidas en la proteína de partida.

5

En una realización preferida, la proteína de partida se selecciona de entre proteína de albúmina de suero bovino (BSA), fosfoinositida-3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (PKB), diana de rapamicina en células de mamífero complejo 1 (mTORC1), proteína 9 de unión al retinoblastoma (RBBP9), factor Inducible por Hipoxia-1 (HIF-1), acetilcolinesterasa (ACHE), receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), beta-secretasa 1 (BACE1), y alpha-secretasas.

10

En una realización más preferida, la proteína de partida es la albúmina de suero bovino (BSA).

15

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método de obtención del compuesto de fórmula I, que comprende la reacción de Schiff entre al menos un grupo amino de la proteína de partida y el ligando 2-piridincarboxaldehído (pyca) del complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$ , donde la proteína de partida comprende al menos una lisina.

20

En una realización preferida, la reacción se produce en condiciones suaves, de manera que se evita la desnaturalización de la proteína. Así, ambos compuestos se combinan en presencia de tetrahidrofurano (THF) como disolvente en atmósfera inerte.

25

La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente protegida de la luz durante un tiempo que puede oscilar entre 1 y 1920 h. Una vez transcurrido el tiempo deseado, el disolvente se evapora y el residuo se lava con diclorometano (DCM) para eliminar el complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  que no haya reaccionado.

30

En otra realización preferida, la reacción se produce en condiciones más enérgicas, pero relevantes desde el punto de vista fisiológico. Ambos compuestos se mezclan en presencia de Suero Salino Normal (disolución acuosa de cloruro sódico al 0,9% (p/v)). La mezcla se coloca en un baño de ultrasonidos y se sónica con el objetivo de dispersar al máximo las partículas del complejo metálico. Posteriormente se somete a

35

la muestra a radiación de microondas (MW) a una temperatura de entre 35°C-40°C

agitando a una velocidad de 1200 rpm durante un tiempo que puede oscilar entre 1 y 4 h. Un precipitado amarillo aparece. A la mezcla se añade diclorometano (DCM), se agitan ambas fases y se desecha la fase orgánica para eliminar el complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  sobrante. Posteriormente se filtra el sólido, se lava con agua y se  
 5 seca a vacío.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de proteínas que comprenden la obtención del compuesto de fórmula I tal y como se ha descrito anteriormente, y la posterior medición mediante espectroscopía infrarroja.

10

Un cuarto aspecto de la invención es el uso del complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$ , para la detección de proteínas que comprenden al menos una lisina, mediante espectroscopía infrarroja.

15 En una realización preferida, la proteína se selecciona de entre proteína de albúmina de suero bovino (BSA), fosfoinositida-3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (PKB), diana de rapamicina en células de mamífero complejo 1 (mTORC1), proteína 9 de unión al retinoblastoma (RBBP9), factor Inducible por Hipoxia-1 (HIF-1), acetilcolinesterasa (ACHE), receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), beta-secretasa 1 (BACE1), y alpha-secretasas.

20

En una realización más preferida, la proteína es la albúmina de suero bovino (BSA).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus  
 25 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Espectro de IR en tetrahidrofurano (THF) de las aguas de lavado procedentes del primer modo de preparación preferente (arriba) y en diclorometano (DCM) de las  
 35 aguas de lavado procedentes del segundo modo de preparación preferente (abajo). Se

observan las bandas correspondientes a los grupos carbonilos del complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  de partida asegurando así una eliminación adecuada del reactivo excedente.

5 **FIG. 2.** Espectros de IR en estado sólido de la proteína BSA (arriba), del complejo de partida  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  (centro) y de la proteína cargada tras la realización del segundo modo de preparación preferente (abajo). Se muestra la presencia del fragmento metálico unido a la proteína por la aparición de las bandas correspondientes a los carbonilos coordinados en la zona entre  $1800$  y  $2500\text{ cm}^{-1}$  en contraste con la  
10 inexistencia de señales en el espectro de la proteína pura. Además, la frecuencia de las bandas varía ligeramente debido a la formación de la iminopiridina.

**FIG. 3.** Variación del porcentaje de carga metálica deducido de los análisis por ICP-MS en función del tiempo de reacción para el primer modo de preparación preferente (arriba) y para el segundo modo de preparación preferente (abajo).  
15

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los  
20 inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

### Ejemplo 1. Condiciones suaves de reacción

En un matraz de schlenk se mezclan el complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  (20 mg, 0,052  
25 mmol) (preparado según la publicación Álvarez, C. M.; García-Rodríguez, R.; Miguel, D. *Dalton Trans.* **2012**, 51, 2984-2996), la proteína BSA (56,9 mg,  $8,56 \times 10^{-4}$  mmol) y se agita con una barra magnética. La mezcla se desoxigena y se pone en atmósfera inerte de nitrógeno gas. Después se añaden 15 mL de THF. El conjunto se desoxigena y se pone en atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  de nuevo. Por último, se deja agitando a  
30 temperatura ambiente protegiendo el matraz de la luz durante un tiempo que puede oscilar entre 1 y 1920 h. Transcurrido el tiempo deseado, se retira la barra magnética y se evapora el disolvente a vacío. El residuo resultante se lava con diclorometano ( $3 \times 10$  mL) retirando las aguas de lavado con ayuda de una cánula. En dicho disolvente, el complejo de Renio es soluble y la proteína BSA no, como se puede deducir de la  
35 Figura 1. Por último, el sólido se seca a vacío para dar lugar a una proteína de color

amarillo cuya intensidad va a depender de la cantidad de carga metálica que soporte.

La nueva proteína funcionalizada es insoluble en disolventes orgánicos convencionales y en agua. Cualitativamente se puede observar la presencia del  
 5 fragmento metálico por el espectro de infrarrojo (IR) en el que aparecen claramente las bandas de tensión CO que corresponden con un fragmento *fac*-tricarbonilo, como se muestra en la Figura 2. Cuantitativamente se puede medir la cantidad de Renio incorporada a la biomolécula por un análisis elemental inorgánico proporcionado por Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

10

Esta reacción se realizó varias veces usando las mismas condiciones iniciales y analizando el resultado a distintos tiempos tras el procedimiento de purificación descrito anteriormente, desde 1 hora hasta 1920 (80 días). El porcentaje máximo alcanzado fue alrededor del 44%, que correspondería con una funcionalización de 26  
 15 Lisinas, como se muestra en la Figura 3. El resto de resultados se encuentran recogidos en la Tabla 1.

TABLA 1

| t / h | mg Re / g muestra | %     |
|-------|-------------------|-------|
| 1     | 0,78              | 0,61  |
| 10    | 4,31              | 3,36  |
| 24    | 6,31              | 4,92  |
| 120   | 10,87             | 8,48  |
| 360   | 22,40             | 17,48 |
| 480   | 28,74             | 22,43 |
| 720   | 39,20             | 30,59 |
| 1920  | 57,00             | 44,48 |

20

### **Ejemplo 2. Condiciones energéticas de reacción**

En un vial diseñado para un reactor de microondas se colocan el complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$  (10 mg,  $0,026 \text{ mmol}$ ), la proteína BSA (28 mg,  $4,3 \times 10^{-4} \text{ mmol}$ ) y una  
 25 barra magnética para agitar. Se añaden 5 mL de Suero Salino Normal, la suspensión resultante se tapa y se sónica en el baño de ultrasonidos durante 3 minutos. Tras esto, se ubica el vial en el reactor de microondas y la mezcla se irradia a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  agitando a una velocidad de 1200 rpm durante un tiempo que puede oscilar entre 1 y 4 h. Transcurrido el tiempo deseado, se extrae el vial, que contiene un  
 30 precipitado en su interior, se destapa y se retira la barra magnética. El contenido se

traspasa a un matraz redondo de una boca y se añaden 5 mL de diclorometano. La mezcla bifásica se agita vigorosamente y, tras dejar reposar, se retira la fase orgánica con ayuda de una pipeta Pasteur. Este procedimiento se realiza dos veces más. Por último, el sólido se filtra mediante el uso de una cánula y se lava con agua destilada (3 x 5 mL) para, finalmente, secarlo a vacío.

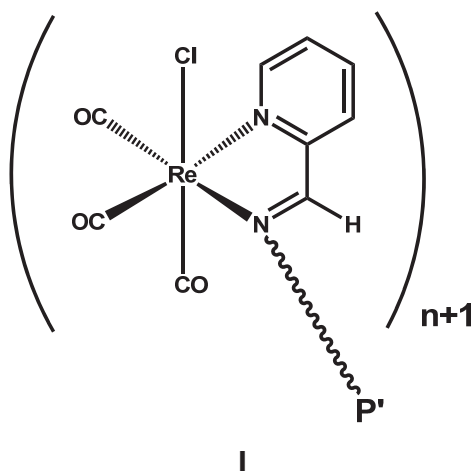
El sólido resultante tiene las mismas características que las observadas mediante el método descrito en el Ejemplo 1, y se puede analizar la incorporación del complejo a la proteína mediante espectro infrarrojo (IR) (Figura 2) y gracias a ICP-MS, alcanzándose una carga máxima de alrededor de 92% (Figura 3), que correspondería con 55 Lisinas funcionalizadas (de 60 en total). Con este modo de realización preferente se puede deducir que prácticamente todos los aminoácidos Lisina que conforman la proteína BSA han sido derivatizados, tanto los accesibles en la superficie externa de la misma como los que no. Esto lleva a la conclusión de que probablemente ha habido un cambio en la estructura terciaria de la biomolécula (desnaturalización) que ha permitido al complejo de coordinación acceder a las Lisinas más internas. El resto de resultados se encuentran recogidos en la Tabla 2.

TABLA 2

| t / h | mg Re / g muestra | %     |
|-------|-------------------|-------|
| 1     | 54,04             | 42,17 |
| 2     | 92,50             | 72,18 |
| 3     | 113,80            | 88,80 |
| 4     | 118,22            | 92,25 |

**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto de fórmula I



5

caracterizado por que P' es una proteína modificada como resultado de la reacción de Schiff entre al menos un grupo amino de la proteína de partida y el ligando 2-piridincarboxaldehído (pyca) del complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$ , donde la proteína de partida comprende al menos una lisina; y n es un número entero de entre 1 y el número de lisinas contenidas en la proteína de partida.

10

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde la proteína de partida se selecciona de entre proteína de albúmina de suero bovino, fosfoinositida-3-quinasa, proteína quinasa B, diana de rapamicina en células de mamífero complejo 1, proteína 9 de unión al retinoblastoma, factor Inducible por Hipoxia-1, acetilcolinesterasa, receptores de N-metil-D-aspartato, beta-secretasa 1, y alpha-secretasas.

15

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde proteína de partida es la proteína albúmina de suero bovino.

20

4. Compuesto según la reivindicación 3, donde n comprende valores enteros comprendidos en el intervalo de entre 1 y 60.

25

5. Método de obtención del compuesto de fórmula I, que comprende la reacción de Schiff entre al menos un grupo amino de la proteína de partida y el ligando 2-

piridincarboxaldehído (pyca) del complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$ , donde la proteína de partida comprende al menos una lisina.

- 5 6. Método según la reivindicación 5, donde la reacción de Schiff se lleva a cabo en tetrahidrofurano, a una temperatura de entre 20-30°C, y durante un tiempo de entre 1 y 1920 horas.
- 10 7. Método según la reivindicación 5, donde la reacción de Schiff se lleva a cabo en un medio acuoso, a una temperatura de entre 35°C-40°C, y durante un tiempo de entre 1 y 4 horas.
- 15 8. Método según la reivindicación 7, donde la reacción se lleva a cabo mediante irradiación por microondas.
- 20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado por que comprende una etapa de purificación posterior a la reacción de Schiff por lavados con un disolvente halogenado y secado final del sólido resultante.
- 25 10. Método para la detección de proteínas que comprenden la obtención del compuesto de fórmula I de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 y la posterior medición mediante espectroscopía infrarroja.
- 30 11. Uso del complejo  $[\text{ReCl}(\text{CO})_3(\text{pyca})]$ , para la detección de proteínas que comprenden al menos una lisina, mediante espectroscopía infrarroja.
12. Uso según la reivindicación 11, donde la proteína se selecciona de entre proteína de albúmina de suero bovino, fosfoinositida-3-quinasa, proteína quinasa B, diana de rapamicina en células de mamífero complejo 1, proteína 9 de unión al retinoblastoma, factor Inducible por Hipoxia-1, acetilcolinesterasa, receptores de N-metil-D-aspartato, beta-secretasa 1, y alpha-secretasas.
13. Uso según las reivindicaciones 11 o 12, donde la proteína es la albúmina de suero bovino.

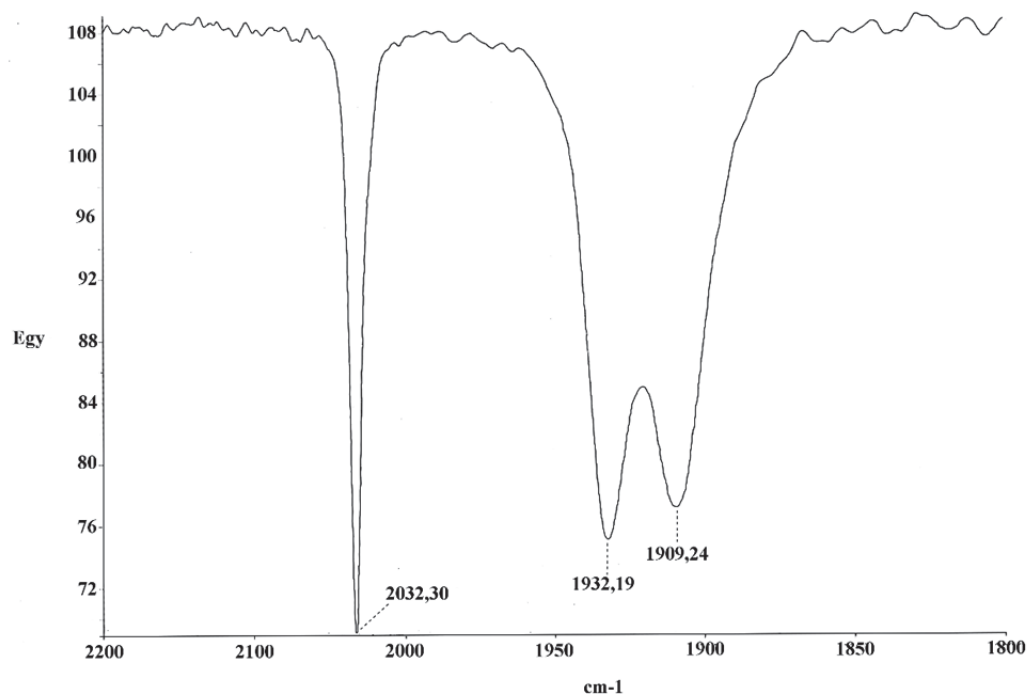
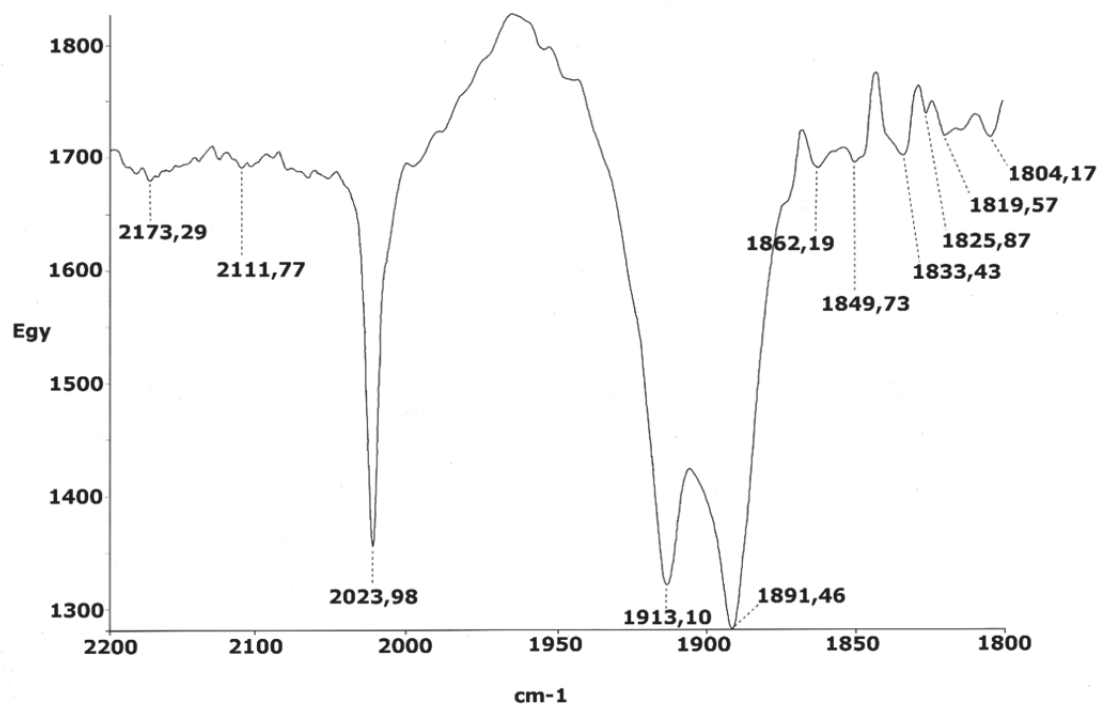


FIG. 1

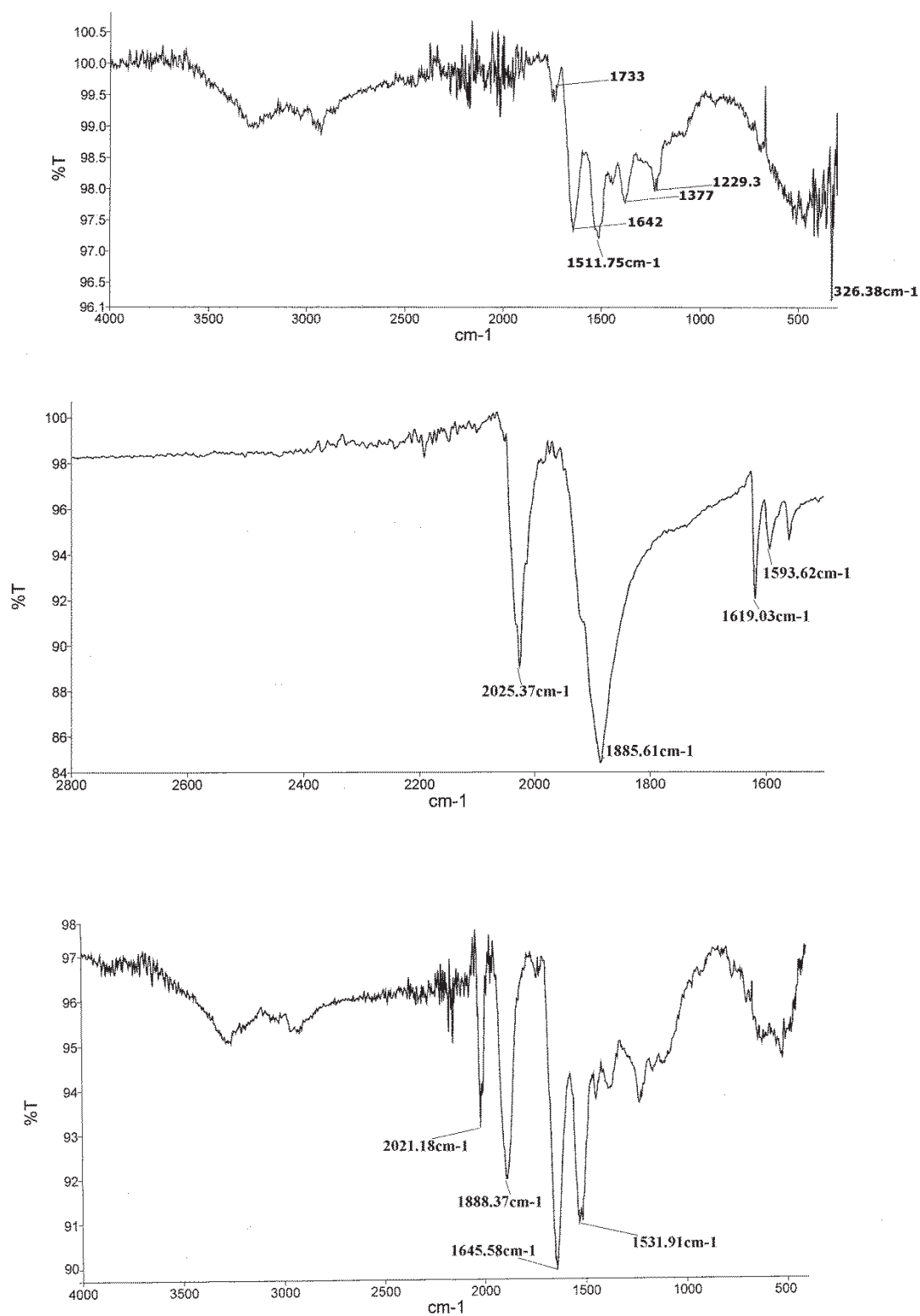


FIG. 2

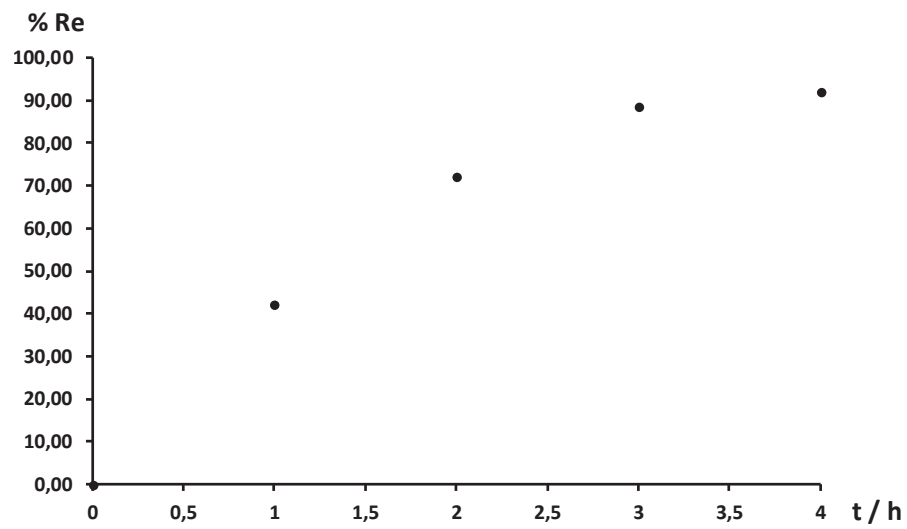
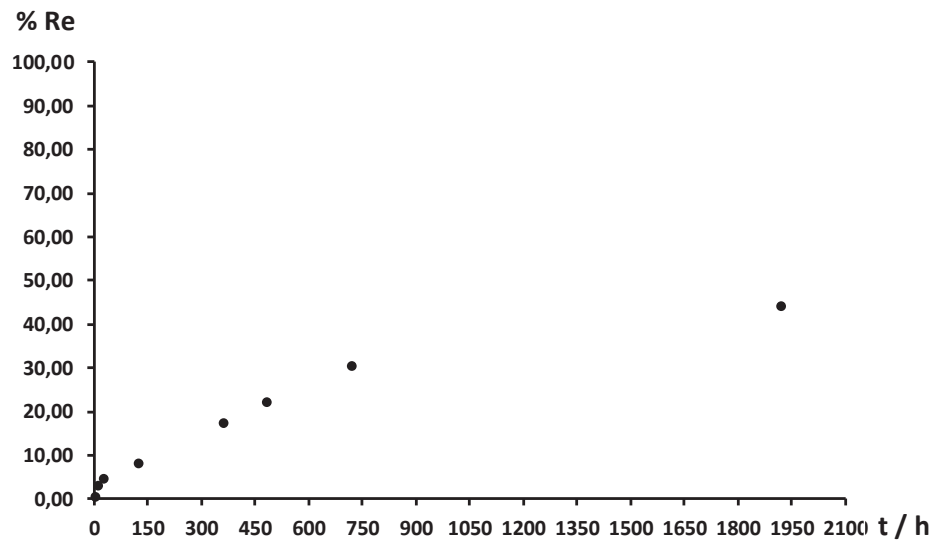


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201731332  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.11.2017  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Y         | COSTA, R. et al. "The synthesis of biologically relevant conjugates of $\text{Re}(\text{CO})_3$ using pyridine-2-carboxaldehyde". JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY, 15/06/2013, Vol. 734, páginas 25-31, <DOI: 10.1016/j.organchem.2012.10.025>, todo el documento, especialmente compuesto 1.                          | 1-10                       |
| Y         | ALVAREZ, C.M et al. "Iminopyridine complexes of Manganese, Rhenium and Molybdenum derived from amino ester methylserine and peptides Gly-Gly, Gly-Val, and Gly-Gly-Gly: self-assembly of the peptide chains". INORGANIC CHEMISTRY, 13/02/2012, Vol. 51, páginas 2984-2996, <DOI: 10.1021/ic2022984>. Materiales y Métodos. | 5, 6, 9                    |
| Y         | MHASKE, G. et al. "Aquamedicated, microwave assisted, synthesis of Schiff bases and their biological evaluation". INTERNATIONAL JOURNAL OF INNOVATIVE RESEARCH IN SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY, Enero 2014, Vol. 3, páginas 8156-8162, ISSN 2319-8753. Introducción y página 8157, Esquema 1.                       | 7-9                        |
| Y         | CHANAWANNO, K. et al. "Facile rhenium-peptide conjugate synthesis using a one-pot derived $\text{Re}(\text{CO})_3$ reagent". DALTON TRANS. 21/03/2016, Vol. 45, Nº 11, páginas 4729-4735, <DOI: 10.1039/c5dt04694g>, todo el documento.                                                                                    | 1-10                       |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-9, 10 (parcialmente)

Fecha de realización del informe  
15.06.2018

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K51/04** (2006.01)**C07F13/00** (2006.01)**C07K14/765** (2006.01)

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

A61K, C07F, C07K

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

INVENES, EPODOC, WPI, CASREACT, HCAPLUS, BIOSIS, INTERNET