



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102000900850399
Data Deposito	31/05/2000
Data Pubblicazione	01/12/2001

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	09	B		

Titolo

OLIGOMERI DEL TIOFENE COME MARCATORI FLUORESCENTI AD ALTA EFFICIENZA PER IL RICONOSCIMENTO E L'ANALISI QUANTITATIVA DI MOLECOLE BIOLOGICHE.



Descrizione tecnica sintetica dell'invenzione industriale dal titolo:  
**Oligomeri del tiofene come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche**

5 di Giovanna Barbarella, Laura Favaretto, Giovanna Sotgiu, Massimo Zambianchi, Roberto Cingolani, Giuseppe Gigli, Franco Cipriani, Gennaro Citro, a mezzo mandatario studio STIM ing. Domenico LAFORGIA ed elettivamente domiciliato agli effetti di legge in Bari, Via Garruba n. 3.

10

-----

Oligomeri del tiofene caratterizzati dall'utilizzo come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche. Secondo ulteriori aspetti il trovato è caratterizzato, inoltre, dalla funzionalizzazione di  
15 fluorofori a base di tiofene che emettono nel visibile e nel vicino infrarosso, con gruppi capaci di legarsi covalentemente a molecole biologiche e biopolimeri; dalla modificazione di fluorofori a base di tiofene con gruppi idrofilici, per ottenere marcatori selettivi legati covalentemente a cellule umane; dalla funzionalizzazione  
20 dello zolfo tienilico dei fluorofori a base di tiofene con atomi di ossigeno allo scopo di minimizzare la fotodegradazione dovuta all'ossigeno di singoletto; dall'uso dei fluorofori a base di oligomeri del tiofene come sonde multicolori per diagnostica biomedica basata su spettrofluorimetria e citofluorimetria di  
25 soluzioni.





Descrizione tecnica dell'invenzione industriale dal titolo:

**Oligomeri del tiofene come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche**

5 Di Giovanna Barbarella, Laura Favaretto, Giovanna Sotgiu, Massimo Zambianchi, Roberto Cingolani, Giuseppe Gigli, Franco Cipriani, Gennaro Citro, a mezzo mandatario studio STIM ing. Domenico LAFORGIA ed elettivamente domiciliato agli effetti di legge in Bari, Via Garruba n. 3.

10

-----

Forma oggetto del presente brevetto la funzionalizzazione dei fluorofori a base di oligomeri del tiofene da impiegarsi come marcatori di specie biologiche in diagnostica chimica quantitativa.

15 Allo stato attuale esistono poche molecole organiche fluorescenti che possono essere usate come markers per molecole biologiche e diagnostica chimico/medica. Le più comuni sono la fluoresceina, la rodamina e i loro derivati che emettono nel verde e nel rosso. Dette molecole presentano alcuni inconvenienti, ed in particolare, la mancanza di molecole fluorescenti con caratteristiche di: alta  
20 efficienza; accordabilità cromatica e capacità di legarsi in maniera covalente alle molecole biologiche, impedisce di fatto l'uso di spettroscopie e citofluorimetrie avanzate per la misura parallela di numerose specie biologiche e di reazioni diverse simultaneamente. Infatti, a fronte di un vasto repertorio di tecniche biologiche che  
25 permettono di marcare differenti siti di un biopolimero, non esiste



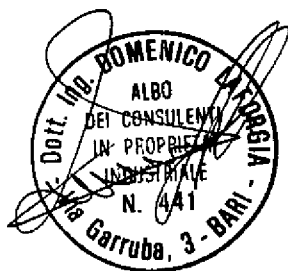


tuttora un numero sufficientemente grande di fluorofori che emettano su un ampio intervallo di frequenze (colori) permettendo così l'uso estensivo delle tecniche spettrofluorimetriche per la diagnostica biochimica e/o biomedica.

5 In tale contesto, la necessità di misurare più indicatori biologici simultaneamente rende necessario lo sviluppo di nuovi marcatori fluorescenti per l'analisi di reazioni biologiche complesse. Lo sviluppo di nuove molecole fluorescenti che emettono nel visibile con alta efficienza è pertanto di grande importanza. Per esempio,  
10 fluorofori che emettono su diversi colori e capaci di legarsi covalentemente a proteine potrebbero essere impiegati nella preparazione di kit diagnostici per rivelare simultaneamente la presenza di piccole quantità di diversi antigeni in campioni biologici liquidi.

15 Gli oligomeri del tiofene sono noti materiali semiconduttori con grande potenzialità di applicazione nel campo degli emettitori di luce (LED) e dei dispositivi elettronici (FET) organici e come precursori per la preparazione di politiofeni. Tali composti sono caratterizzati da una alta efficienza di emissione sia in soluzione  
20 che nello stato solido.

L'efficienza di emissione in soluzione dipende dalla lunghezza dell'oligomero, e può raggiungere valori massimi di 60% (sexitiofene non sostituito). Sfortunatamente però, gli oligotiofeni non sostituiti sono scarsamente solubili, e sin'ora non è stato  
25 possibile impiegarli come marcatori per molecole biologiche in





soluzione.

Il trovato oggetto della presente invenzione risolve i problemi tecnici sopra menzionati in quanto trattasi di oligomeri del tiofene caratterizzati dall'utilizzo come marcatori fluorescenti ad alta  
5 efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche.

Secondo ulteriori aspetti il trovato è caratterizzato, inoltre, dalla funzionalizzazione (cioè dal miglioramento della funzione di una molecola per mezzo di sostituzioni con opportuni gruppi chimici)  
10 di fluorofori a base di tiofene che emettono nel visibile e nel vicino infrarosso, con gruppi capaci di legarsi covalentemente a molecole biologiche e biopolimeri; dalla modificazione di fluorofori a base di tiofene con gruppi idrofilici, per ottenere marcatori selettivi legati covalentemente a cellule umane; dalla  
15 funzionalizzazione dello zolfo tienilico dei fluorofori a base di tiofene con atomi di ossigeno allo scopo di minimizzare la fotodegradazione dovuta all'ossigeno di singoletto; dall'uso dei fluorofori a base di oligomeri del tiofene come sonde multicolori per diagnostica biomedica basata su spettrofluorimetria e  
20 citofluorimetria di soluzioni, che rimpiazzano i coloranti convenzionali operanti su pochi colori fissi.

Questi ed altri vantaggi appariranno nel corso della descrizione dettagliata dell'invenzione che si ritiene, comunque, del tutto esemplificativa e non limitativa.

25 Gli oligomeri del tiofene hanno una grande efficienza di





fluorescenza in soluzione, dipendentemente dal solvente, dalla temperatura e dallo stato di aggregazione. La frequenza dell'emissione (colore della fluorescenza) può essere variata finemente mediante la funzionalizzazione selettiva delle posizioni

5 alfa e beta della catena aromatica e/o dello zolfo tienilico. In questo modo derivati degli oligotiofeni con diversi colori di fluorescenza possono essere simultaneamente eccitati da una stessa sorgente di luce ultravioletta. Tali composti possono inoltre essere funzionalizzati con gruppi capaci di legarsi covalentemente

10 alle molecole biologiche. Sulla base di queste proprietà proponiamo l'uso degli oligomeri del tiofene funzionalizzati come marcatori fluorescenti per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche in diagnostica medica e biochimica.

15 Gli oligomeri del tiofene possono essere resi solubili in solventi organici e/o acqua mediante un'appropriata funzionalizzazione delle posizioni alfa e beta della catena aromatica. Inoltre la funzionalizzazione dello zolfo tienilico al corrispondente S,S-diossido causa un forte incremento dell'efficienza quantica di

20 emissione, permettendo così di ottenere una nuova classe di molecole che possono essere usate anche per la marcatura fluorescente di campioni biologici.

Il presente brevetto riguarda quindi una nuova classe di oligomeri del tiofene funzionalizzati nella catena aromatica e allo zolfo

25 tienilico da impiegarsi come marcatori fluorescenti di molecole





biologiche e polimeri. La gap ottica e la frequenza di emissione degli oligomeri del tiofene dipendono dalla coniugazione  $\pi - \pi$  della catena aromatica. Tale coniugazione può essere finemente variata cambiando l'angolo diedro fra gli anelli adiacenti della molecola (0 e 180 gradi corrispondono al massimo overlap e all'emissione rossa mentre 90 gradi corrisponde al minimo overlap e all'emissione blue). La scelta della natura e della posizione dei sostituenti permettono la sintesi di composti con efficienza di fluorescenza molto alta in soluzione e colore della fluorescenza variabile a piacimento nell'intero spettro visibile e vicino infrarosso. Inoltre, la grande stabilità chimica e la facilità di funzionalizzazione, permettono l'introduzione di una grande varietà di gruppi funzionali, inclusi quelli capaci di formare legami covalenti con acidi nucleici, peptici e proteine. In questo modo gli oligomeri del tiofene possono essere funzionalizzati con specie diverse in modo da potersi legare covalentemente alle molecole biologiche, ed emettere un'intensa fluorescenza di colore predeterminato.

Gli oligomeri del tiofene vengono funzionalizzati con gruppi del tipo: NCS, NH<sub>2</sub>, CHO, COOH, SH. I blocchi contenenti questi gruppi vengono preparati e assemblati allo scopo di ottenere oligomeri di lunghezza voluta. Alternativamente gli oligomeri di lunghezza desiderata possono prima essere sintetizzati e poi funzionalizzati con i gruppi menzionati. Le proprietà optoelettroniche di emissione, efficienza e accordabilità cromatica





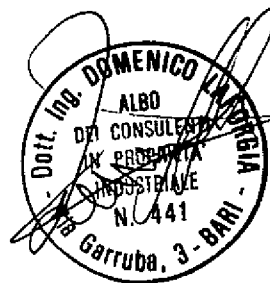
sono standardizzate rispetto ai cambiamenti dell'ambiente  
circostante (che influenza la ricombinazione non-radiativa e  
l'emissione dei fluorofori mediante intersystem crossing a tempi di  
vita degli stati di tripletto), per mezzo di un controllo fine del PH  
5 della soluzione, della concentrazione di ioni e del tipo di solvente.  
I fluorofori a base di tiofene per la marcatura di molecole  
biologiche hanno i seguenti vantaggi: alta efficienza di  
fluorescenza in soluzione; ampia variazione di colori della  
fluorescenza dal visibile al vicino infrarosso, ottenuta mediante  
10 piccole modificazioni della struttura molecolare; stessa natura  
chimica per tutti i marcatori, indipendentemente dal colore della  
fluorescenza, che permette la standardizzazione delle procedure di  
funzionalizzazione (diversamente dai fluorofori convenzionali che  
richiedono una chimica specifica da sviluppare caso per caso);  
15 possibilità di eccitare tutti i marcatori fluorofori simultaneamente  
mediante una unica sorgente luminosa ultravioletta; alta stabilità  
chimica dei fluorofori grazie alla funzionalizzazione dello zolfo  
tienilico; possibilità di immobilizzare fluorofori con più di un  
gruppo sostituito sulle macromolecole biologiche e incrementare  
20 ulteriormente l'efficienza di fluorescenza, permettendo così di  
misurare dosaggi estremamente bassi; possibilità di misurare in  
parallelo e simultaneamente diverse specie chimiche mediante  
fluorofori funzionalizzati operanti su diversi colori. Questo diventa  
uno strumento nuovo e potente che migliora sensibilmente gli  
25 attuali limiti della citofluorimetria quantitativa.





Infatti, un esempio dettagliato di realizzazione dell'invenzione è proprio quello relativo alla marcatura cromogena di molecole biologiche per scopi biodiagnostici. Attualmente si usano delle molecole fluorofere che vengono legate a diversi tipi di cellule (ad esempio, globuli bianchi o rossi, anticorpi, albumina, ecc.). La luce emessa dalle cellule marcate (di diverso colore a seconda della molecola fluorofora legata) viene misurata da apparati spettroscopici chiamati citofluorimetri in modo da avere un conteggio quantitativo delle cellule. Tale tecnica, comunemente denominata citofluorimetria, è alla base di tutte le tecniche di analisi comuni (ad esempio, analisi del sangue).

La molecola oggetto della presente invenzione ha il vantaggio di poter emettere su molte frequenze diverse permettendo così la marcatura di diverse cellule simultaneamente nella stessa soluzione. In questo modo è possibile fare della citofluorimetria quantitativa "parallela", marcando cioè molte più cellule simultaneamente di quanto si possa fare coi fluorofori convenzionali, grazie alla accordabilità in frequenza dei tiofeni modificati. Nella pratica di laboratorio, la molecola di tiofene è legata alla cellula da marcare con gruppi isocianati. La cellula così marcata è eccitata da una sorgente di luce ultravioletta ed emette la radiazione specifica del tiofene ad essa legato.





## RIVENDICAZIONI

- 1) Oligomeri di tiofene caratterizzati dall'utilizzo come marcatori fluorescenti ad alta efficienza per il riconoscimento e l'analisi quantitativa di molecole biologiche.
- 2) Oligomeri di tiofene secondo la rivendicazione 1, caratterizzati dalla funzionalizzazione di fluorofori a base di tiofene che emettono nel visibile e nel vicino infrarosso, con gruppi capaci di legarsi covalentemente a molecole biologiche e biopolimeri.
- 3) Oligomeri di tiofene secondo le rivendicazioni 1 o 2, caratterizzati dalla modificazione di fluorofori a base di tiofene con gruppi idrofilici, per ottenere marcatori selettivi legati covalentemente a cellule umane.
- 4) Oligomeri di tiofene secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzati dalla funzionalizzazione dello zolfo tienilico dei fluorofori a base di tiofene con atomi di ossigeno allo scopo di minimizzare la fotodegradazione dovuta all'ossigeno di singoletto.
- 5) Uso di fluorofori a base di oligomeri del tiofene come sonde multicolori per diagnostica biomedica basata su spettrofluorimetria e citofluorimetria di soluzioni.
- 6) Oligomeri di tiofene secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzati da quanto precedentemente descritto.

