

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
15 de Febrero de 2007 (15.02.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/017540 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07D 495/04 (2006.01) **G01N 33/82** (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

y Farmaceutica, Universidad Complutense de Madrid,
E-28040 MADRID (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2006/000451

(74) Mandatario: **OFICINA DE TRANSFERENCIA DE
RESULTADOS DE INVESTIGACION;** c/Donoso
Cortes, 65, ES-28015 (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
1 de Agosto de 2006 (01.08.2006)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200501927 2 de Agosto de 2005 (02.08.2005) ES

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible*): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo
US*): **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**
[ES/ES]; Rectorado Avenida de Séneca, 2, E-28040
Madrid (ES).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **HERNAIZ
GOMEZ-DEGANO, Maria José** [ES/ES]; FACULTAD
DE FARMACIA, Dpto. Química Organica y Farma-
céutica, Universidad Complutense de Madrid, E-28040
MADRID (ES). **MUÑOZ SILES, Javier** [ES/ES]; Facul-
tad De Farmacia, Dpto. Química Organica y Farmaceutica,
Universidad Complutense de Madrid, E-28040 MADRID
(ES). **FERNANDEZ FERNANDEZ, Maria** [ES/ES];
Facultad De Farmacia, Dpto. Química Organica y Farma-
ceutica, Universidad Complutense de Madrid, E-28040
MADRID (ES). **SINISTERRA GAGO, José Vicente**
[ES/ES]; Facultad De Farmacia, Dpto. Química Organica

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

(54) Title: NOVEL BIOTIN REAGENT, METHODS OF PREPARING AND LABELLING SAME AND USES THEREOF

(54) Título: NUEVO REACTIVO DE BIOTINA, MÉTODOS PARA SU PREPARACIÓN Y MAREAJE, Y APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to a novel biotin reagent, methods of preparing and labelling same and uses thereof. More specifically, the invention relates to a novel reagent of biotin, biotin chloride or chloride of 5-((3aS,4S,6aS)-2-oxo-hexahydro-1H-tieno[3,4-d]imidazole-4-yl)pentanoyl, as well as the one-step preparation and the one-step labelling of same. Both the biotin chloride and the biotinylate marker can be bound to a large number of biomolecules (proteins, enzymes, peptides, oligosaccharides or lipids), thereby enabling the use of same in studies analysing the involvement of said biomolecules in biological processes and in the preparation of diagnostic systems.

(57) Resumen: Nuevo reactivo de biotina, métodos para su preparación y mareaje, y aplicaciones. La presente invención presenta un nuevo reactivo de biotina, el cloruro de biotina o cloruro de 5-((3aSr,4>Sr,6a1S)-2-oxo-hexaliidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoilo, su preparación en una sola etapa, así como su mareaje también en una sola etapa. Además, tanto el cloruro de biotina como el marcador biotinilado pueden unirse a un amplio número de biomoléculas (proteínas, enzimas, péptidos, oligosacáridos o lípidos) lo que permite su utilización en estudios para analizar la implicación de dichas biomoléculas en procesos biológicos así como su utilización en la preparación de sistemas de diagnóstico.

WO 2007/017540 A1

Nuevo reactivo de biotina, métodos para su preparación y marcaje, y aplicaciones.

5 **OBJETO DE LA INVENCION:**

La invención se encuadra dentro del área de la Química Orgánica y Bioquímica con aplicación en los sectores de Biotecnología y Biomedicina. Más concretamente se refiere al desarrollo de un nuevo reactivo de biotina y su utilización en la preparación
10 de derivados marcados así como a su unión a biomoléculas.

ESTADO DE LA TÉCNICA:

La biotina (vitamina H) es una molécula soluble en agua que se encuentra a bajas
15 concentraciones en la sangre y en los tejidos. Su función biológica es actuar como una molécula transportadora del grupo carboxilo. La biotina se encuentra unida covalentemente a la enzima piruvato carboxilasa. Un grupo carboxilo activado, derivado de un ión bicarbonato, se acopla a la biotina a través de una reacción que requiere un aporte de energía procedente de la hidrólisis de una molécula de ATP. A
20 continuación este grupo carboxilo se trasfiere al grupo metilo del piruvato formando oxalacetato.

La biotina también se une con una alta afinidad a avidina, glicoproteína de 63 Kda, y a otras proteínas relacionadas como streptavidina, proteína no glicosidada ($K_d=10^{-15}$ M, Green NM. *Adv. Prot. Chem.* 1975; 29, 85–133.). La afinidad entre avidina y biotina
25 presenta un gran número de aplicaciones, por ejemplo, el complejo avidina-biotina ha sido utilizado como sistema de detección donde la molécula diana está combinada con la biotina a través de su grupo carboxilo terminal, de esta forma las moléculas biotiniladas pueden ser fácilmente detectadas y separadas de la solución. La
30 biotinilización de la molécula diana puede llevarse a cabo sin cambiar las propiedades biológicas o físico-químicas de la molécula diana y sin afectar la capacidad de unión de la biotina a la avidina.

La fuerte interacción entre streptavidina (o avidina) y biotina (Gitlin, G.; Bayer, E.A. and Wilchek, M. 1987, *Biochem. J.* 242, 923-926, Gitlin, G.; Bayer, E.A. and Wilchek, M. 1988, *Biochem. J.* 250, 291-294) es bien conocida, de hecho es una de las más fuertes, dentro de las interacciones biológicas no covalentes.

La unión tiene lugar rápidamente y es estable en un amplio rango de pH, temperatura y condiciones desnaturalizantes, lo cual ha permitido el desarrollo de un amplio y diverso número de aplicaciones utilizando la tecnología streptavidina-biotina o avidina-biotina. (Savage et al., *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, 1992:1-23, Rockford, Pierce Chemical Company).

La afinidad biotina-streptavidina es una de las más utilizadas en ensayos moleculares, inmunológicos y celulares. La streptavidina puede detectarse y cuantificarse con un alto grado de sensibilidad en el complejo formado, por ejemplo marcándola con una enzima o un marcador fluorescente o radiactivo. El marcaje de streptavidina también ha sido utilizado para detectar proteínas en la superficie celular, para visualizar y cuantificar blots y llevar a cabo ensayos tipo ELISA (P. Vincent, *Journal of Immunological Methods*, 165; 177-182, 1993).

La streptavidina también puede ser inmovilizada en una superficie de modo que permita capturar moléculas o células biotiniladas. Estas superficies pueden ser utilizadas para detectar las moléculas de interés a partir de mezclas complejas. Por ello la interacción streptavidina-biotina ha sido ampliamente utilizada en gran número de procesos de separación, purificación y aislamiento, como por ejemplo por cromatografía de afinidad, etc. Esta misma aproximación se ha utilizado para llevar a cabo estudios de interacciones entre biomoléculas mediante la utilización de biosensores basados en la resonancia de plasmón de superficie (SPR).

La inmovilización de oligonucleótidos y ácidos nucleicos es frecuentemente utilizada en muchos procedimientos de biología molecular y en muchas otras técnicas como secuenciación, amplificación, preparación del cDNA y purificación de ácidos nucleicos. Esta metodología ha sido adaptada para su uso en fase sólida, utilizando un

soporte cubierto con streptavidina. También se han preparado micropartículas magnéticas de streptavidina-biotina para su utilización en PCR (polymerase chain reaction) (Hultman et al., *Nucleic Acids Res.* 17:4937-4946, 1989). Este método presenta gran interés, da lugar a buenos rendimientos y se automatiza fácilmente comparado con los métodos tradicionales de purificación basados en la precipitación y centrifugación.

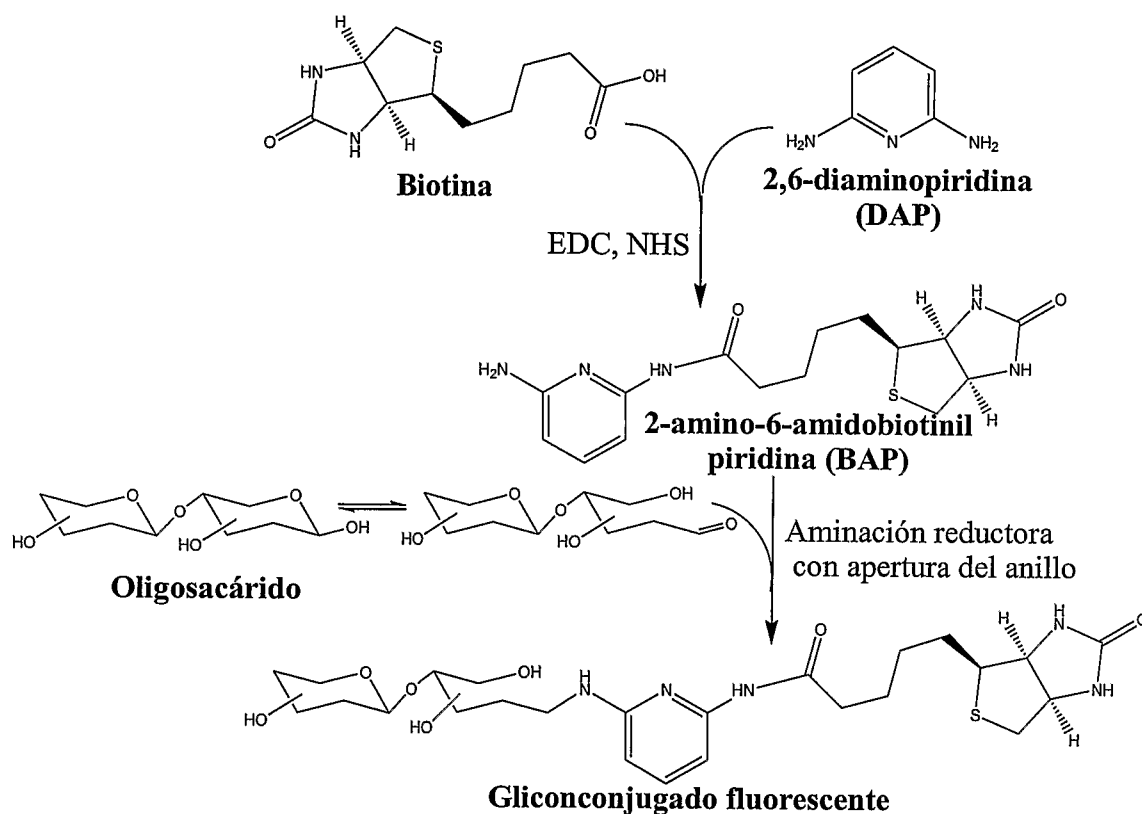
La mayor parte de las aplicaciones están basadas en la unión irreversible streptavidina-biotina, sin embargo en aquellos casos en los que sea necesaria la disociación del complejo también es posible llevarla a cabo y recuperar de esta forma las moléculas o células biotiniladas (Lee et al., *Anal Biochem.* 206:206-207, 1992, Elgar et al., *DNA Sequence* 2:219-226, 1992, and Conrad et al., *Nucleic Acids Res.* 20:6423-6424, 1992 and Tong et al., *Anal. Chem.* 64:2672-2677, 1992).

La biotina es un compuesto heterocíclico no aromático con una cola de 4-carboxibutilo. En los derivados la biotina se une a través del 4-carboxibutilo a un conector (espaciador) que puede ser asociado a una biomolécula (proteína, carbohidratos, DNA, lípido, fármaco, etc.). Todos los procedimientos descritos para llevar a cabo la reacción entre la biotina y el grupo amino de la molécula objeto de estudio utilizan los coadyuvantes típicos de la formación del enlace peptídico como son NHS y EDC, activantes de grupos amino y carboxilo respectivamente. Los rendimientos descritos en la bibliografía para este proceso son bajos (30 %) y el procedimiento tedioso.

Por otro lado, para poder utilizar estas moléculas en el estudio de procesos biológicos es importante marcar estas moléculas para de esta forma poder hacer un seguimiento de las mismas. El método más sencillo y rápido de marcaje de los biomoléculas es la introducción de un fluoróforo. Uno de los marcadores fluorescentes utilizados en la bibliografía es la 2,6-diaminopiridina, en cuya estructura, la presencia de los dos grupos amino permite por una parte su unión a la biomolécula convenientemente funcionalizada, y por otra parte su posterior unión a una molécula de biotina, que se une fuertemente y de manera selectiva a la avidina. Toomre y col' (*Glycobiology*, 8;

653-663, 1994) emplean la biotina y la 2,6-diaminopiridina con coadyuvantes típicos de la formación del enlace peptídico como son NHS y EDC. Los rendimientos descritos en la bibliografía para este proceso son del 31% (esquema 1).

5



Esquema 1. Formación de un glicoconjugado fluorescente con apertura del anillo del oligosacárido.

10

DESCRIPCION DE LA INVENCION

15 Nuevo reactivo de biotina, métodos para su preparación y marcaje, y aplicaciones.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un nuevo reactivo de biotina, el cloruro de biotina o cloruro de 5-((3a*S*,4*S*,6a*S*)-2-oxo-hexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanoilo.

Así mismo, otro aspecto de la presente invención hace referencia al método para la preparación de este reactivo de biotina que permite su reacción de una forma rápida y sencilla con cualquier biomolécula correctamente funcionalizada, así como su marcaje
5 con un marcador.

El método de preparación de cloruro de biotina que se describe es de fácil realización y, además, con él se obtienen altos rendimientos, alta reactividad y gran aplicación. La preparación del cloruro de biotina es un procedimiento sencillo que conlleva una sola
10 etapa que consiste en la adición de cloruro de tionilo a la biotina. Inmediatamente precipita un sólido que es el producto de reacción que se aísla fácilmente, por ejemplo mediante una simple filtración a vacío. El rendimiento obtenido es del 75%.

Otro aspecto que contempla la invención es el marcaje del cloruro de biotina. El
15 marcaje puede realizarse con un marcador fluorescente o un marcador radiactivo. El marcaje fluorescente consiste en un procedimiento sencillo que conlleva una sola etapa, es decir la adición del fluoróforo a una disolución del cloruro de biotina en el disolvente apropiado (10% DMF (dimetilformamida) o DMSO (dimetilsulfóxido) y 90% disolvente en el que sea soluble el fluoróforo). Entre los fluoróforos puede
20 utilizarse la 2,6-diaminopiridina, marcador fluorescente que absorbe al Ultravioleta-Visible. Transcurrido el tiempo necesario, 6 horas, se forma un precipitado que se obtiene por métodos sencillos como es el filtrado. Se obtienen rendimientos del 100 %.

25 Tanto el nuevo reactivo de biotina como el marcador biotinilado pueden ser unidos a un amplio número de biomoléculas (proteínas, enzimas, péptidos, oligosacáridos o lípidos) lo que permite su utilización en estudios para analizar su implicación en procesos biológicos o en la preparación de sistemas de diagnóstico. Este proceso puede llevarse a cabo de una forma sencilla y consistente en una sola etapa, es decir la
30 adición de la biomolécula a una disolución del cloruro de biotina en el disolvente apropiado (10% DMF (dimetilformamida) o DMSO (dimetilsulfóxido) y 90% disolvente en el que sea soluble la biomolécula). Se obtienen rendimientos del 95 %.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **Figura 1.** Marcaje fluorescente del cloruro de biotina (2) con 2,6-diaminopiridina (3). Mediante la adición de cloruro de tionilo (SOCl_2) a la biotina (1) se obtiene cloruro de biotina (2) que queda marcado al añadirse 2,6-diaminopiridina (3) obteniéndose el marcador biotinilado (4) con un rendimiento del 100%.
- 10 **Figura 2.** Preparación de una biomolécula biotinilada (6) utilizando el nuevo cloruro de biotina (2). Mediante la adición de la biomolécula (5) a una disolución de cloruro de biotina (2) se obtiene la molécula biotinilada (6) con un rendimiento del 95%.

15 ➤ **MODO DE REALIZAR LA INVENCION**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance, que viene definido exclusivamente por la nota reivindicatoria adjunta.

20

Ejemplo 1. Preparación del cloruro de biotina

A 1 g (4,09 mmol) de biotina, en un matraz de fondo redondo provisto de un núcleo de agitación magnética, se le añadieron 8 ml (109,7 mmol) de cloruro de tionilo. La
25 disolución del sólido fue inmediata. A los pocos segundos precipitó el cloruro de ácido en forma de sólido blanco. El sólido se filtró a vacío. Se eliminaron los restos de cloruro de tionilo con alto vacío y el sólido se lavó con acetona. Rendimiento 75%.

Análisis calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: C: 45,71%; H: 5,75%; N: 10,66%; S:
30 12,20%.

Encontrado: C: 40,45%; H: 5,44%; N: 9,31%; S: 10,74%.

EM: m/z 78 (100), 63 (92), 45 (16), 184 (10), 112 (8), 85 (7), 97 (7), 144 (6), 166 (6), 226 (2), 244 (2), 60 (48).

IR: 3250, 1702, 1653, 1481, 1319, 1271.

^1H -RMN (500 MHz, DMSO): 6,44 (sa, 2H, -NH); 4,31 (dd, 1H, $J = 4,5$ y $7,7$ Hz, H-1'); 4,13 (dd, 1H, $J = 4,4$ y $7,8$ Hz, H-5'); 3,42 (ddd, 1H, $J = 1,7$, $2,8$ y $6,0$ Hz, H-6'); 2,80 (dd, 1H, $J = 5,0$ y $12,5$ Hz, H-8' β); 2,57 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz, H-8' α); 2,18 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-2); 1,76 (m, 1H, H-5' α); 1,64 (m, 3H, H-4 y H-5 α); 1,49 (m, 2H, H-3).

^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO): 174,78 (COOH), 163,55 (C-3'), 68,25 (C-5'), 66,93 (C-1'), 60,64 (C-6'), 44,90 (C-2), 38,90 (C-8'), 33,49 (C-3), 33,18 (C-4), 29,77 (C-5).

Ejemplo 2. Marcaje fluorescente del cloruro de biotina

En un matraz de fondo redondo y provisto de un núcleo de agitación, se colocaron 0,3 g (2,7 mmol) de 2,6-diaminopiridina y 1ml (7,2 mmol) de trietilamina disueltos en 10 ml de diclorometano seco. La mezcla se agitó hasta disolución. A esta solución se adicionó lentamente una solución formada por 0,35 g (1,33 mmol) de cloruro de biotina en 15 ml de diclorometano seco y 2 ml de dimetilsulfóxido. Se agitó durante 6 h y se obtuvo un precipitado blanco, se filtró a vacío y se lavó con acetona. Rendimiento 100 %.

Análisis calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: C: 53,71%; H: 6,31%; N: 20,88%; S: 9,56%.

Encontrado: C: 53,74%; H: 6,28%; N: 20,84%; S: 9,56%.

IR (v en cm^{-1}): 3407, 3275, 1684, 1659, 1641, 1459, 1399.

EM: m/z 63 (100), 78 (71), 45 (20), 109 (20), 97 (16), 85 (10), 184 (10), 244 (2).

^1H -RMN (500 MHz, d_6 -DMSO): 6,99 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-4'); 6,44 (s, 1H, NH_2); 6,36 (s, 1H, NH_2); 5,58 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-3' y H-5'); 5,31 (sa, 3H, -NH, H-2'' y H-4''); 4,29 (dd, 1H, $J = 5,1$, $J = 7,6$ Hz, H-1''); 4,11 (dddd, 1H, $J = 1,7$, $J = 3,3$, $J = 5,5$, $J = 7,7$ Hz, H-5''); 3,43 (dddd, 1H, $J = 1,7$, $J = 3,3$, $J = 5,5$, $J = 7,7$ Hz, H-5''); 2,80 (dd, 1H, $J = 5,0$, $J = 12,4$ Hz, H-8'' β); 2,56 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz, H-8'' α); 2,18 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, H-2); 1,76 (m, 1H, H-5' α); 1,64 (m, 3H, H-4 y H-5 α); 1,49 (m, 2H, H-3).

^{13}C -RMN (125 MHz, d_6 -DMSO): 180,21 (C-1), 168,30 (C-3''), 164,22 (C-6' y C-2'), 143,85 (C-4'), 100,71 (C-3' y C-5'), 66,62 (C-5''), 65,81 (C-1''), 64,74 (C-6''), 60,99 (C-8'') 39,08 (C-2), 33,70 (C-3), 33,62 (C-4), 30,13 (C-5).

5 Ejemplo 3. Preparación de biomolécula biotinilada con cloruro de biotina.

En un matraz de fondo redondo y provisto de un núcleo de agitación se colocaron 50 mg (0,16 mmol) de *p*-anilin-*N*-acetilglucosaminopiranosido y 1 mL de trietilamina disueltos en 10 mL de agua. La mezcla se agitó hasta disolución. A esta solución se
 10 adicionó lentamente una solución formada por 42 mg (0,16 mmol) de cloruro de biotina en 1 mL *N,N*-dimetilformamida. Se continuó la agitación durante 72 h. Transcurrido este tiempo se eliminó el disolvente a alto vacío. Rendimiento 95 %

Análisis calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$: C: 53,52%; H: 6,36%; N: 10,40%; S: 5,95%.

15 **Encontrado:** C: 53,62%; H: 6,24%; N: 10,84%; S: 5,56%.

IR (ν en cm^{-1}): 3297, 3051, 2934, 2847, 1701, 1650.

^1H -RMN (500 MHz, d_6 -DMSO): 10,20 (s, 1H, Ar-NH-CO); 8,49 (s, 3H, OH); 8,20 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, NH-CO-CH₃); 7,45 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz, H-3'' y H-5''); 6,87 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz, H-2'' y H-6''), 6,45 (s, 1H, H-3'), 6,39 (s, 1H, H-1'), 4,9 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'''); 4,31 (dd, 1H, $J = 5,4$, $J = 7,4$ Hz, H-6'a); 4,13 (dddd, 1H, $J = 1,6$, $J = 1,9$, $J = 2,8$, $J = 7,6$ Hz, H-3'a); 3,67 (dd, 1H, $J = 1,8$, $J = 10,3$ Hz, H-3'''); 3,41 (dd, 2H, $J = 5$, $J = 12,4$ Hz, H-4''' y 5'''); 3,22 (m, 3H, H-6''' y OH-CH₂); 2,89 (dd, 1H, $J = 5,1$, $J = 12,4$ Hz, H-6'β); 2,75 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz, H-6'α); 2,56 (ddd, 1H, $J = 1,7$, $J = 2,7$, $J = 6$ Hz, H-4'); 2,2 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-2); 2,15 (s, 3H, NHCOCH₃);
 20 1,76 (m, 1H, H-5); 1,64 (m, 3H, H-4 y H-5); 1,49 (m, 2H, H-3).

^{13}C -RMN (125 MHz, d_6 -DMSO): 175,0 (C-1), 169,9 (NHCO-CH₃), 165,2 (C-2'), 163,0 (C-4''), 135,3 (C-1'), 125,7 (C-2'' y C-6''); 120,5 (C-3'' y C-5''); 105,1 (C-2'''); 82,4 (C-6'''), 78,3 (C-4'''), 76,4 (C-5'''); 67,2 (C-3'a); 65,3 (C-6'a); 66,2 (C-4'); 61,0 (C-6'); 59,3 (C-3'''); 40,1 (C-2), 39,2 (CH₂OH); 31,0 (C-3), 28,6 (C-4),
 25 28,1 (C-5); 25,0 (NHCOCH₃).

➤ REIVINDICACIONES

- 5 1. Reactivo de biotina caracterizado por ser cloruro de biotina o cloruro de 5-
((3a*S*,4*S*,6a*S*)-2-oxo-hexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanoilo.
2. Método de preparación de cloruro de biotina, que comprende los siguientes pasos:
- 10 a) adición de cloruro de tionilo a biotina
b) precipitado del cloruro de biotina
c) obtención del sólido precipitado
d) eliminación de restos de cloruro de tionilo
e) lavado del sólido
- 15 3. Método de preparación de cloruro de biotina, según la reivindicación 2,
caracterizado porque la obtención del sólido precipitado se realiza por filtrado al
vacío.
- 20 4. Método de preparación de cloruro de biotina, según la reivindicación 2,
caracterizado porque la eliminación de los restos de cloruro de tionilo se realiza
mediante alto vacío.
- 25 5. Método de preparación de cloruro de biotina, según la reivindicación 2,
caracterizado porque el lavado del sólido se realiza con acetona.
- 30 6. Método de marcaje de cloruro de biotina que comprende los siguientes pasos:
- a) disolución del marcador
b) adición del marcador al cloruro de biotina en presencia del disolvente
adecuado
c) obtención del precipitado
d) lavado del precipitado

7. Método de marcaje de cloruro de biotina, según reivindicación 6, caracterizado porque el disolvente utilizado es un 10% de dimetilformamida o de dimetilsulfóxido y un 90% de disolvente en el que sea soluble el marcador
- 5 8. Método de marcaje de cloruro de biotina, según reivindicación 6, caracterizado porque el marcaje se realiza con un fluoróforo.
9. Método de marcaje de cloruro de biotina, según reivindicación 8, caracterizado porque el fluoróforo utilizado es 2,6-diaminopiridina.
- 10 10. Método de marcaje de cloruro de biotina, según reivindicación 6, caracterizado porque la agitación se realiza durante 6 horas.
11. Método de marcaje de cloruro de biotina, según reivindicación 6, caracterizado
15 porque la obtención del sólido precipitado se realiza por filtración a vacío.
12. Método de preparación de cloruro de biotina, según la reivindicación 6, caracterizado porque el lavado del sólido se realiza con acetona.
- 20 13. Método de preparación de moléculas biotiniladas que comprende los siguientes pasos:
 - a) disolución de la biomolécula
 - b) adición de la biomolécula al cloruro de biotina en presencia del disolvente adecuado
 - 25 c) obtención del precipitado
14. Método de preparación de moléculas biotiniladas, según reivindicación 13, caracterizado porque el disolvente utilizado es un 10% de dimetilformamida o de dimetilsulfóxido y un 90% de disolvente en el que sea soluble la biomolécula.
- 30 15. Metodo de preparación de moléculas biotiniladas, según reivindicación 13, caracterizado porque la obtención del precipitado se realiza mediante filtración.

16. Método de preparación de moléculas biotiniladas, según reivindicación 13, caracterizado porque las biomoléculas son proteínas, enzimas, péptidos, oligosacáridos o lípidos.
- 5
17. Método de preparación de moléculas biotiniladas, según reivindicación 13, caracterizado porque el cloruro de biotina está marcado.
18. Uso de cloruro de biotina, según reivindicaciones anteriores, en el estudio de la implicación de biomoléculas o análogos de las mismas en procesos biológicos.
- 10
19. Uso de cloruro de biotina, según reivindicaciones 1 a 17, para la elaboración de sistemas de diagnóstico.

1/2

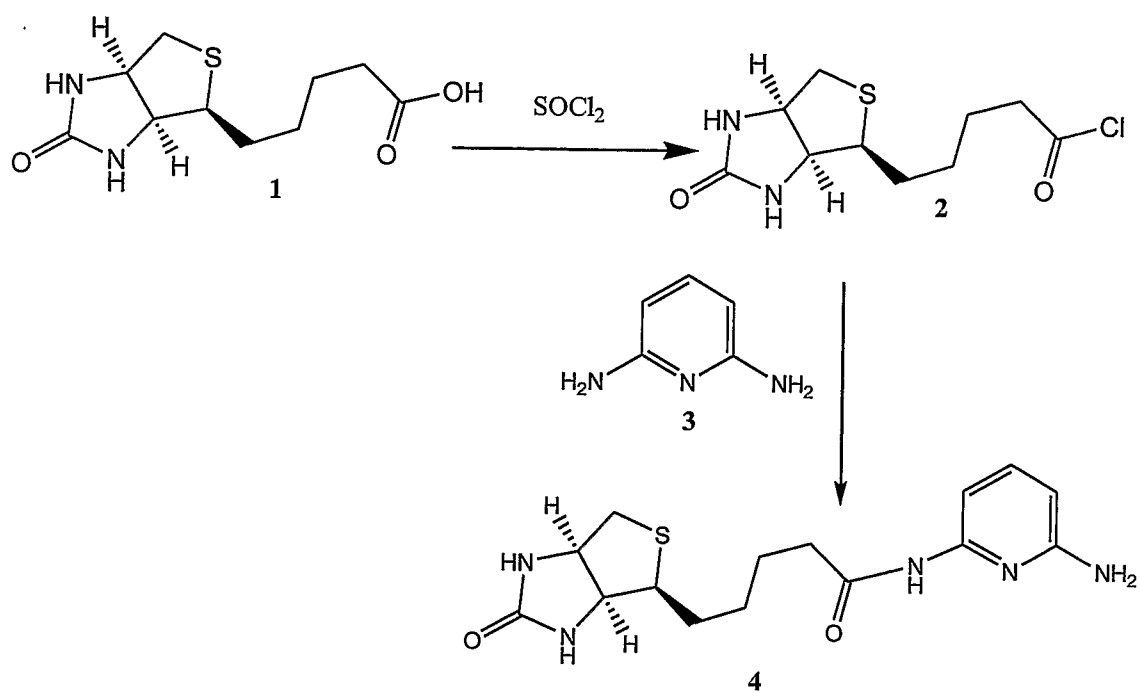
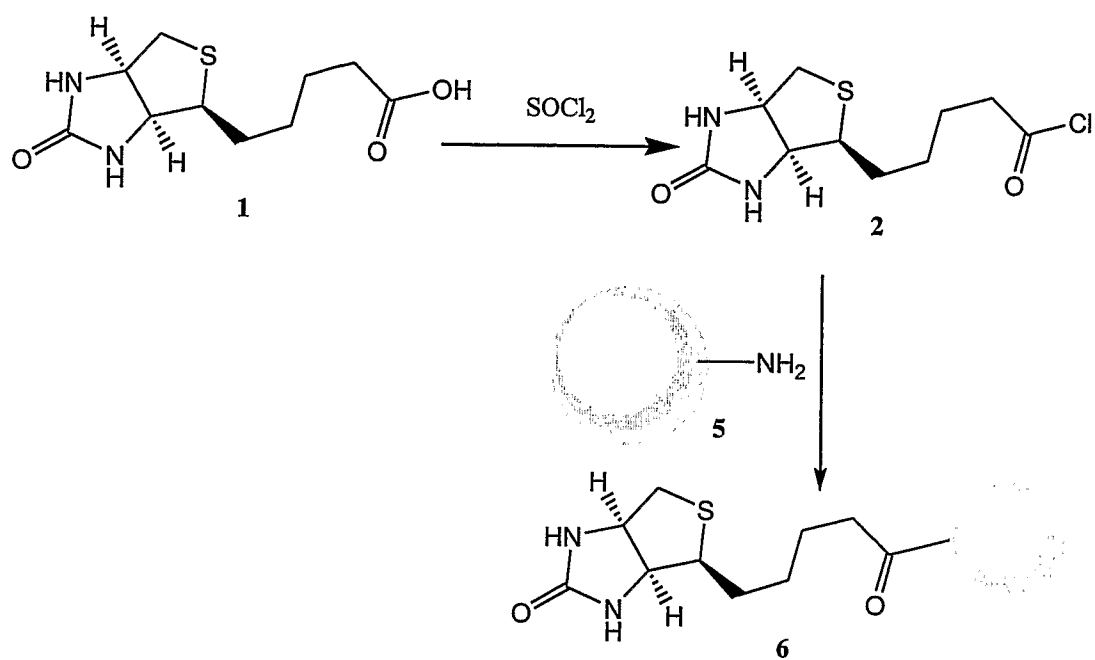


Fig. 1

2/2

**Fig. 2**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2006/000451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D,G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT,EPODOC,WPI,CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2519530 (WOLF et al), 22-08-1950 example 1	1,2
A	ROTHENBERG B et al, "Biotinylated diaminopyridine: an approach to tagging oligosaccharides and exploring their biology". Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1993, vol. 90, n° 24, pages 11939- 11943.	6-18
A	TOOMRE et al, "Advances in the use of biotinylated diaminopyridine (BAP) as a versatile fluorescent tag for oligosaccharides". Glycobiology, 1994, vol. 4, pages 653-663. Pages 653-654, conclusions, experimental methods	6-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 September 2006 (04.09.2006)

Date of mailing of the international search report

(16-01-2007)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

P. Fernández Fernández

Telephone No. +34 91 349 5489

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2006/000451

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1415995 A2 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY), 06-05-2004 claims 3-6	13-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2006/000451

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2519530A A	22.08.1950	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
EP 1415995 A	06.05.2004	WO 9531429 A	23.11.1995
		CA 2189848 A	23.11.1995
		AU 2635995 A	05.12.1995
		EP 0763009 A	19.03.1997
		US 5643722 A	01.07.1997
		JP 10500409 T	13.01.1998
		US 5922858 A	13.07.1999
		US 5948624 A	07.09.1999
		US 5986076 A	16.11.1999
		US 6057096 A	02.05.2000
		US 6344320 B	05.02.2002
		US 6358689 B	19.03.2002
		US 2002123032 A	05.09.2002
		US 6566070 B	20.05.2003
		US 2003059785 A	27.03.2003
		US 6919179 B	19.07.2005
		US 6596481 B	22.07.2003
		US 2003162198 A	28.08.2003
		US 6949341 B	27.09.2005
		US 2003190680 A	09.10.2003
		US 2004033514 A	19.02.2004
		US 2004053217 A	18.03.2004
		AT 275539 T	15.09.2004
		DE 69533478 D	14.10.2004
		US 2005074748 A	07.04.2005
		DE 69533478 T	22.09.2005
		JP 2006006328 A	12.01.2006
		US 2006024704 A	02.02.2006
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2006/000451

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 495/04 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2006/000451

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07D,G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT,EPODOC,WPI,CAS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 2519530 (WOLF et al), 22-08-1950 ejemplo 1	1,2
A	ROTHENBERG B et al, "Biotinylated diaminopyridine: an approach to tagging oligosaccharides and exploring their biology". Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1993, vol. 90, nº 24, páginas 11939-11943.	6-18
A	TOOMRE et al, "Advances in the use of biotinylated diaminopyridine (BAP) as a versatile fluorescent tag for oligosaccharides". Glycobiology, 1994, vol. 4, páginas 653-663. Páginas 653-654, conclusiones, parte experimental	6-18

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

04 Septiembre 2006 (04.09.2006)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

16 enero 2007 (16-01-2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

P. Fernández Fernández

Nº de teléfono +34 91 349 5489

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 2006/000451

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	EP 1415995 A2 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY), 06-05-2004 reivindicaciones 3-6	13-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2006/000451

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US2519530A A	22.08.1950	NINGUNO	-----
EP 1415995 A	06.05.2004	WO 9531429 A	23.11.1995
		CA 2189848 A	23.11.1995
		AU 2635995 A	05.12.1995
		EP 0763009 A	19.03.1997
		US 5643722 A	01.07.1997
		JP 10500409 T	13.01.1998
		US 5922858 A	13.07.1999
		US 5948624 A	07.09.1999
		US 5986076 A	16.11.1999
		US 6057096 A	02.05.2000
		US 6344320 B	05.02.2002
		US 6358689 B	19.03.2002
		US 2002123032 A	05.09.2002
		US 6566070 B	20.05.2003
		US 2003059785 A	27.03.2003
		US 6919179 B	19.07.2005
		US 6596481 B	22.07.2003
		US 2003162198 A	28.08.2003
		US 6949341 B	27.09.2005
		US 2003190680 A	09.10.2003
		US 2004033514 A	19.02.2004
		US 2004053217 A	18.03.2004
		AT 275539 T	15.09.2004
		DE 69533478 D	14.10.2004
		US 2005074748 A	07.04.2005
		DE 69533478 T	22.09.2005
		JP 2006006328 A	12.01.2006
		US 2006024704 A	02.02.2006

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 495/04 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)