



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 302 544**

⑤1 Int. Cl.:
C09K 11/06 (2006.01)
C07D 209/12 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **04768710 .8**
⑧6 Fecha de presentación : **30.09.2004**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1668091**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

⑤4 Título: **Compuesto fluorescente.**

③0 Prioridad: **03.10.2003 GB 0323171**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2008

⑦3 Titular/es: **Coventry University**
Priory Street
Coventry CV1 5FB, GB

⑦2 Inventor/es: **Lynch, Daniel Eric y**
Heptinstall, John

⑦4 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

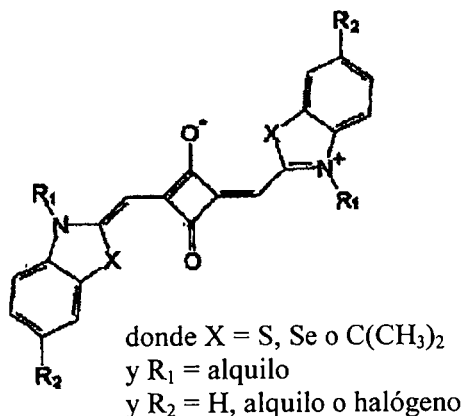
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Compuesto fluorescente.

La presente invención se refiere a nuevos compuestos fotoluminiscentes, a un nuevo detector de proteínas y a un nuevo método para detectar la presencia de proteínas en un fluido, en particular agua, o fluidos corporales.

Se conocen compuestos fotoluminiscentes, y los compuestos fotoluminiscentes conocidos incluyen la clase de colorantes conocidos como colorantes de cuadradina, en particular la serie indolenina de los colorantes de cuadradina, que son compuestos sustituidos y no sustituidos de fórmula general:



Los colorantes de cuadradina de indolenina conocidos incluyen compuestos tanto simétricos como asimétricos y se describen, por ejemplo, en un artículo de E. Terpetschnig *et al.* en *Anal. Chim. Acta* 282 (1993), páginas 633-641.

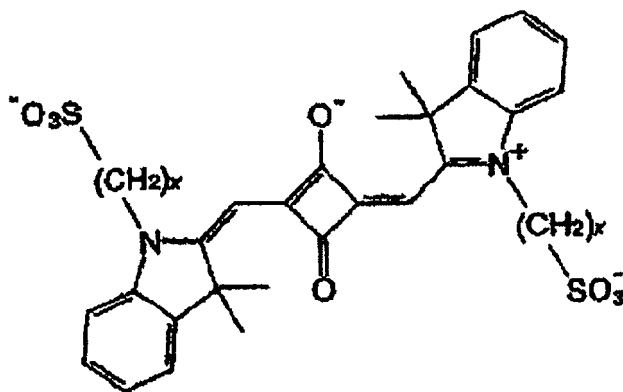
Estos colorantes son insolubles en agua y se utilizan, entre otros, para la detección cualitativa de la presencia de proteínas en fluidos. Para utilizar estos colorantes en la detección de la presencia de proteínas, que son ellas mismas solubles en agua en un fluido, en particular en un fluido acuoso, se debe disolver el colorante en un disolvente que comprenda una mezcla de agua y alcohol como por ejemplo metanol. Cuando se añade proteína sobre una solución de agua/metanol de un colorante de cuadradina de indolenina, se produce un aumento de fluorescencia. El método analítico que se revela en el artículo que se ha citado anteriormente es un método puramente cualitativo, que simplemente registra la presencia o ausencia de proteína en la muestra de fluido del ensayo, y en consecuencia no se puede utilizar para determinar la cantidad de proteína presente.

Los métodos actuales para el análisis cuantitativo de proteínas en fluidos, y cuantitativo/semicuantitativo como son las tinciones para proteínas en geles, incluyen los métodos de Bradford [M. M. Bradford en *Anal. Biochem.* 72 (1976), 248], de Lowry [O. H. Lowry *et al.* en *J. Biol. Chem.* 193 (1951), 265] y los métodos del ácido bicinonínico (ABC) para fluidos [P. K. Smith *et al.* en *Anal. Biochem.* 150 (1985), 76] y de la tinción con plata [C. R. Merrill en *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 477] y el Azul de Coomassie [S. Fazekas de St. Groth *et al.* en *Biochim. Biophys. Acta* 71 (1963), 377] para geles. Los métodos de Bradford, Lowry y ABC son técnicas colorimétricas (es decir, de cambio de color) y son adecuados para los rangos de proteínas en solución de 8 - 2000 µg/ml, requieren múltiples reactivos y tiempos de incubación y sufren de interferencias de numerosos reactivos comunes. El Azul de Coomassie, que se utiliza en el método de Bradford, requiere 20-30 minutos y no queda limitado por los tampones de tris. La tinción con plata es una técnica cromatogénica muy sensible (10 - 100 ng/ml) y se utiliza como tinción de geles pero se debe tener cuidado en la manipulación del gel y la técnica completa requiere 2 - 3 horas. El Azul de Coomassie también es una tinción de geles y se puede utilizar en lugar de la tinción con plata si el rango de proteínas está en el rango cromatogénico de los µg. Otras técnicas comerciales para la detección de la concentración de proteínas incluyen el Equipo de Cuantificación de Proteínas NanoOrange® y el Equipo de Cuantificación de Proteínas CBQCA®, ambos de Molecular Probes, que son técnicas en solución ultrasensibles que dependen de cambios en la fluorescencia pero que no son lineales dentro de los rangos que se proporcionan para el derivado de cuadradina. Estas dos técnicas también requieren 30 minutos de tiempo de preparación.

Es un objetivo de la presente invención preparar un nuevo compuesto fotoluminiscente, en particular un nuevo compuesto fotoluminiscente que sea soluble en agua, o en mezclas de disolventes que contengan agua, y que retenga sus propiedades de fotoluminiscencia en estos medios.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un método para detectar la presencia de proteínas en fluidos, o como una tinción de geles, en la que se reducen o se obvian sustancialmente las restricciones de tiempo anteriores y a una mayor sensibilidad.

La presente invención proporciona compuestos fotoluminiscentes solubles en agua que incluyan una estructura con esqueleto simétrico de fórmula:



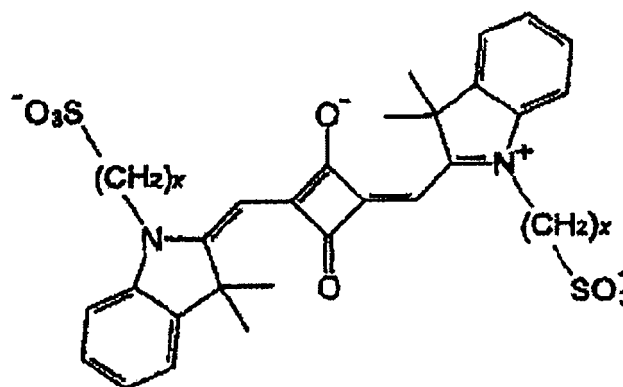
donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos.

Los compuestos particularmente preferidos de acuerdo con la invención incluyen aquellos en los que $x = 3$.

Otros compuestos preferidos de acuerdo con la invención incluyen aquellos que no están sustituidos o en los que uno o ambos anillos de fenilo están sustituidos en la posición 5 con grupos alquilo (incluyendo isopropilo y *tert*butilo) o halógeno.

Los compuestos particularmente preferidos de acuerdo con la invención incluyen el 2,4-bis(ácido 1-(3-propanosulfónico)-3,3-dimetil-2-indolinilidenmetil)ciclobutendiilio-1,3-diolato o cualquier sal metálica o de nitrógeno cuaternaria (es decir, amonio, mono-, di- o trialquilamonio, piridinio, etc.) del ácido sulfónico.

La presente invención además proporciona un detector de proteínas, que comprende un compuesto que incluye una estructura con esqueleto simétrico de fórmula general:

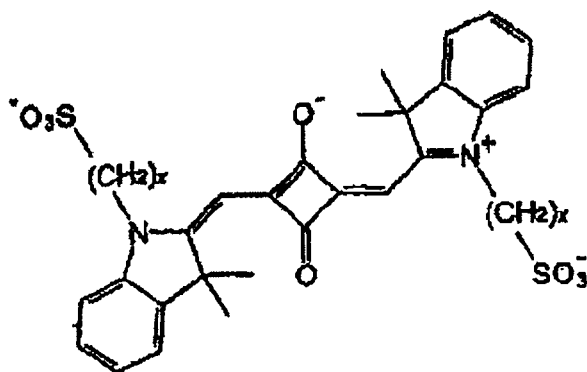


donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos, en solución en agua o en una mezcla de disolventes que contenga agua, a concentraciones desde 1×10^{-9} hasta 1 mol por litro.

ES 2 302 544 T3

La presente invención proporciona además un método para determinar el contenido total de proteínas disueltas de una muestra de fluido, método que incluye los pasos de:

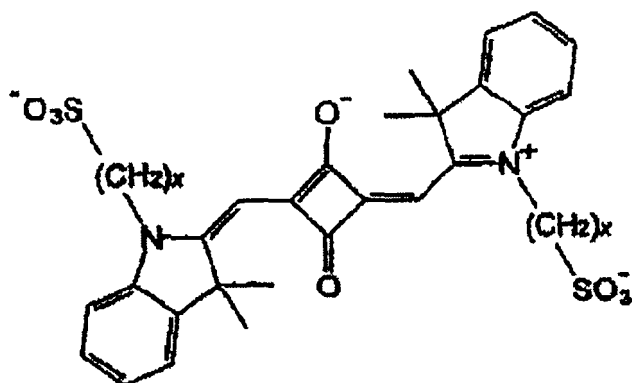
- (a) disolver un compuesto que incluya una estructura de esqueleto simétrico de la fórmula general:



donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos, en solución acuosa a concentraciones desde 1×10^{-10} hasta 1 mol por litro.

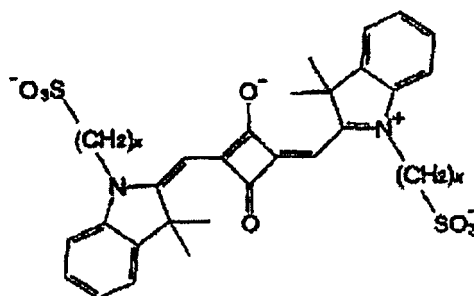
- (b) mezclar la solución del paso (a) con una muestra de fluido del ensayo;
- (c) medir la fluorescencia de la muestra; y
- (d) comparar la fluorescencia con un valor o valores estándar (es decir, curva de calibración), para obtener un valor para el contenido total de proteínas.

La presente invención proporciona además un método para detectar y/o cuantificar proteínas que se han separado electroforéticamente en una matriz de soporte, por ejemplo poliacrilamida, agarosa o almidón, ya sea en presencia o en ausencia de dodecilsulfato sódico (SDS), que se ha fijado en una mezcla acuosa/orgánica/ácida que comprende metanol acuoso y ácido acético, donde a continuación se tiñe la matriz con un compuesto fotoluminiscente que incluye una estructura con esqueleto simétrico de la fórmula general:



donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos, en solución en metanol acuoso al 10% o en ácido acético acuoso, a una concentración desde 1×10^{-10} hasta 1 mol por litro, y que se destiñe para visualizar bandas.

Para establecer los valores estándar para la fluorescencia de soluciones acuosas de proteínas sobre los rangos de detección requeridos, se midió la fluorescencia de soluciones que contenían concentraciones conocidas de la proteína BSA, utilizando una solución acuosa 5×10^{-8} M del compuesto que incluye una estructura con esqueleto simétrico de fórmula:



donde $x = 3$

Colorante 1

a una longitud de onda de excitación de 624 nm ($\epsilon = 1,0 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y a una longitud de onda de detección de 638 nm.

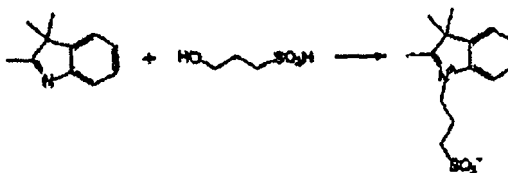
Los resultados, para dos curvas de calibración por separado sobre el rango 0-100 ng/ml de BSA se muestran en la Figura 1; los resultados para tres curvas de calibración por separado, sobre el rango de detección de 0-500 ng/ml de BSA se muestran en la Figura 2 y los resultados, para tres curvas de calibración por separado, sobre el rango de detección de 0-10 $\mu\text{g/ml}$ de BSA se muestran en la Figura 3.

Es particularmente sorprendente observar la respuesta lineal dentro de estos rangos de detección.

También es una ventaja de los compuestos fotoluminiscentes de la presente invención, que una vez se ha construido una curva de calibración utilizando BSA entonces se puede determinar instantáneamente cualquier número de concentraciones de proteínas. La fluorescencia también está en una longitud de onda elevada y no queda enmascarada por ninguna fluorescencia orgánica de longitud de onda menor difusa.

Experimental

Materiales de partida



Se preparó 2,3,3-trimetil-1-(3-propansulfonil)indolenina usando el método de la literatura de E. Havinga *et al.* en *Synthetic Metals* 69 (1995), páginas 581-582, calentando 2,3,3-trimetilindolenina con un exceso de 1,3-propansulfona y tolueno, utilizando un aparato Dean-Stark. Después de enfriar se separó el exceso de disolvente por decantación y se lavó el producto repetidamente con éter de petróleo hasta obtener un aceite rojo. Se formaron cristales de 2,3,3-

trimetil-1-(3-propansulfonil)indolenina a partir del aceite tras dejarlo reposar durante varias semanas y se muestra la única estructura de rayos X en la Figura 4.

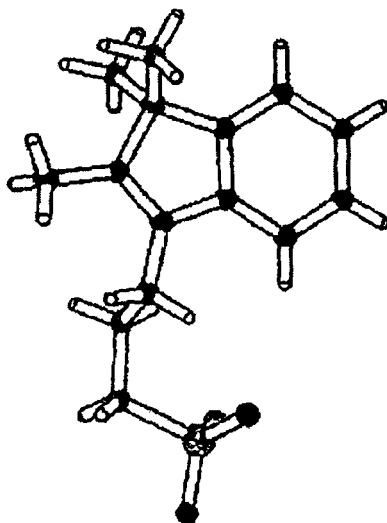
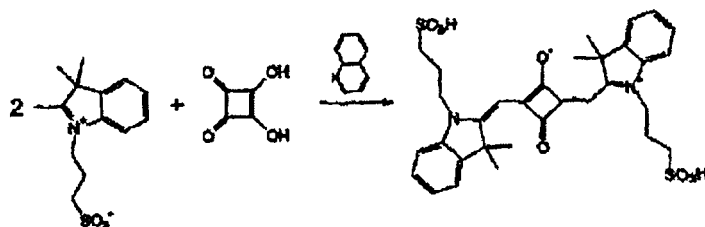


Figura 4

Conformación molecular y esquema de numeración de los átomos para la estructura de la 2,3,3-trimetil-1-(3-propansulfonil)indolenina.

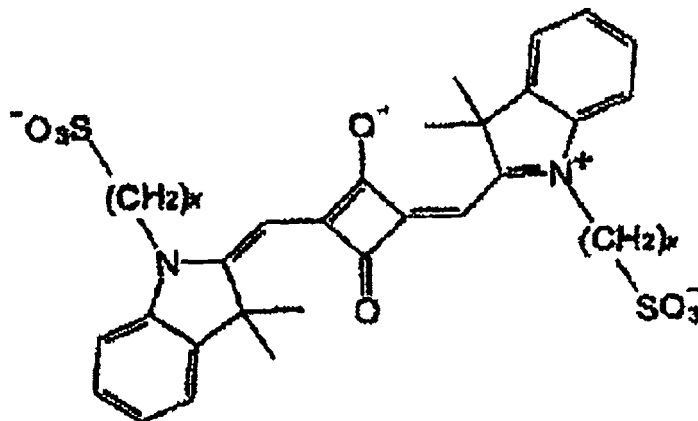
Preparación del Colorante 1



Se preparó el 2,4-bis(1-(ácido 3-propansulfónico)-3,3-dimetil-2-indolinilidenmetil)ciclobutenbis(ilio)-1,3-diolato utilizando el método de la literatura de Sprenger y Ziegenbein en *Angew. Chem. Int. Ed.* 6 (1967), página 553 poniendo a reflujo cantidades molares 2:1 de 2,3,3-trimetil-1-(3-propansulfonil)indolenina y ácido cuadrádico con cantidades catalíticas de quinolina en tolueno/1-butanol 50/50 utilizando un aparato Dean-Stark. Se recogió el producto a vacío después de la eliminación de los disolventes de la reacción y lavados repetidos en caliente con éter de petróleo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto fotoluminiscente que incluye una estructura con esqueleto simétrico de fórmula:



donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos.

2. Un compuesto fotoluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1 donde $x = 3$.

3. Un compuesto fotoluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que no está sustituido.

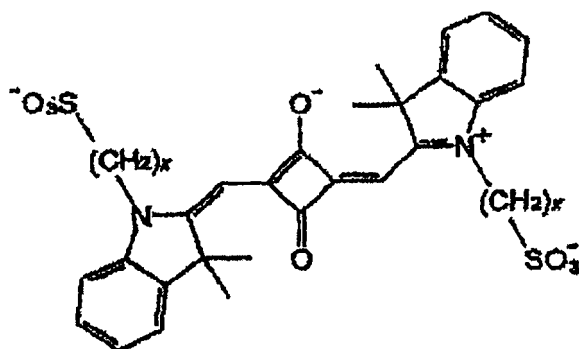
4. Un compuesto fotoluminiscente de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde uno o más anillos de fenilo están sustituidos en la posición 5 con grupos alquilo, incluyendo isopropilo y *tert*butilo, o halógeno.

5. Un compuesto fotoluminiscente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es 2,4-bis(1-(ácido 3-propansulfónico)-3,3-dimetil-2-indolinilidenmetil)ciclobutendiilio-1,3-diolato.

6. Un compuesto fotoluminiscente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona a partir de cualquier sal metálica o de nitrógeno cuaternario del grupo ácido propilsulfónico.

7. Un compuesto fotoluminiscente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona a partir de una sal de amonio, mono-, di-, trialquilamonio, o piridinio del grupo ácido propilsulfónico.

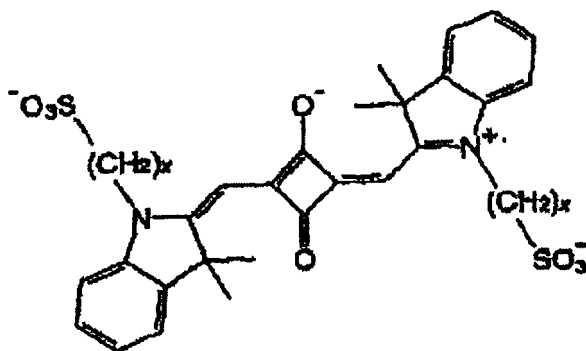
8. Un detector de proteínas, que comprende un compuesto fotoluminiscente que incluye una estructura con esqueleto simétrico de la fórmula general:



donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos, en solución en agua, a concentraciones desde 1×10^{-10} hasta 1 mol por litro.

9. Un método para determinar el contenido total de proteínas disueltas de una muestra de fluido, método que incluye los pasos de:

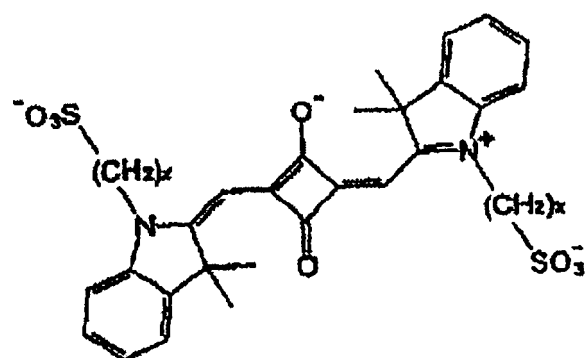
- (a) disolver un compuesto fotoluminiscente que incluye una estructura con esqueleto simétrico de la fórmula general:



donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos, en solución acuosa, a concentraciones desde 1×10^{-10} hasta 1 mol por litro.

- (b) mezclar la solución del paso (a) con una muestra del fluido del ensayo;
(c) determinar la fluorescencia de la muestra; y
(d) comparar la fluorescencia con un valor estándar, para obtener un valor para el contenido total de proteínas disueltas.

10. Un método para detectar y/o cuantificar proteínas separadas electroforéticamente en una matriz de soporte, ya sea en presencia o en ausencia de dodecilsulfato sódico (SDS), que se ha fijado en una mezcla ácida/orgánica/acuosa que comprende metanol acuoso y ácido acético, donde la matriz se tiñe a continuación con un compuesto fotoluminiscente que incluye una estructura con esqueleto simétrico de la fórmula general:



donde x puede representar cualquier entero, y donde los anillos de fenilo pueden estar sustituidos, en solución en metanol acuoso al 10% o en ácido acético acuoso, a una concentración desde 1×10^{-10} hasta 1 mol por litro, y se destiñe para visualizar las bandas.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, donde la matriz de soporte es poliacrilamida, agarosa o almidón.

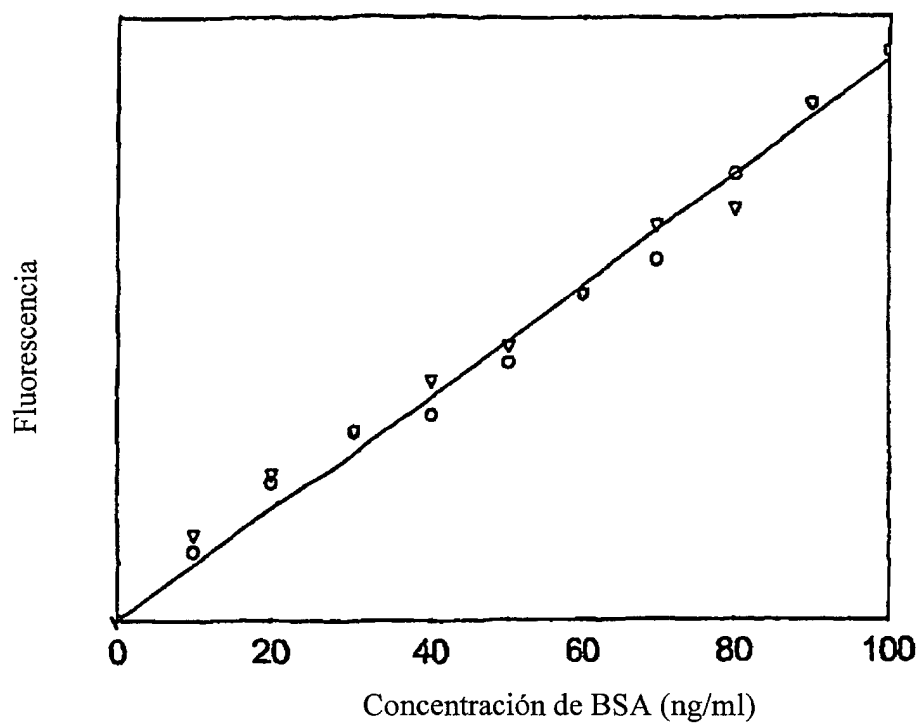


Figura 1

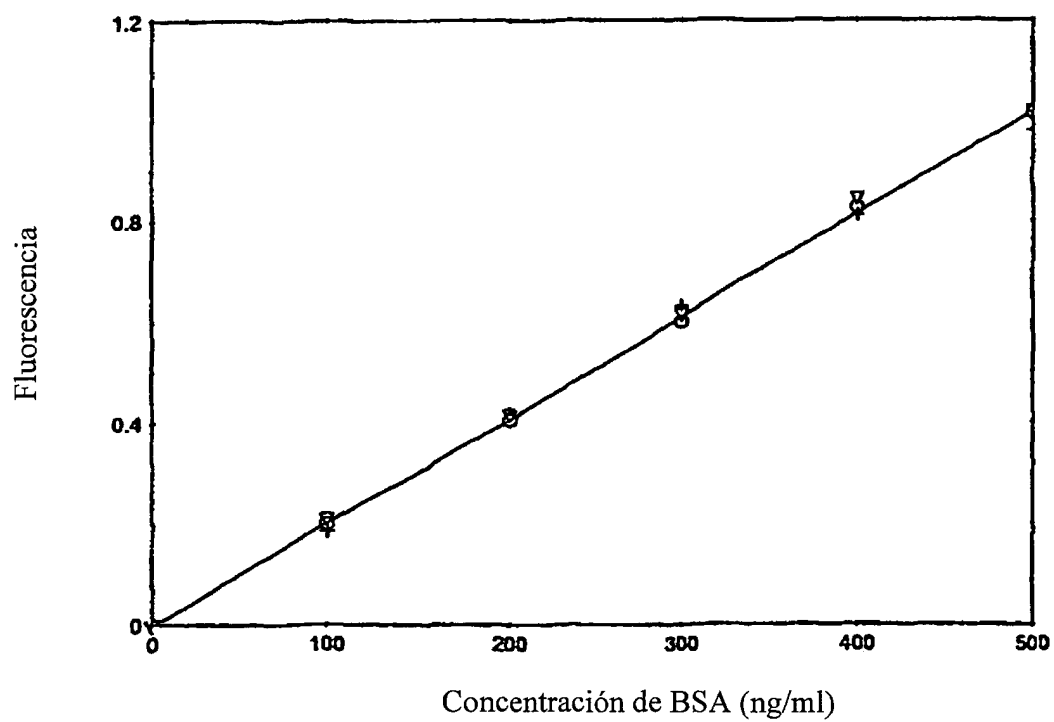


Figura 2

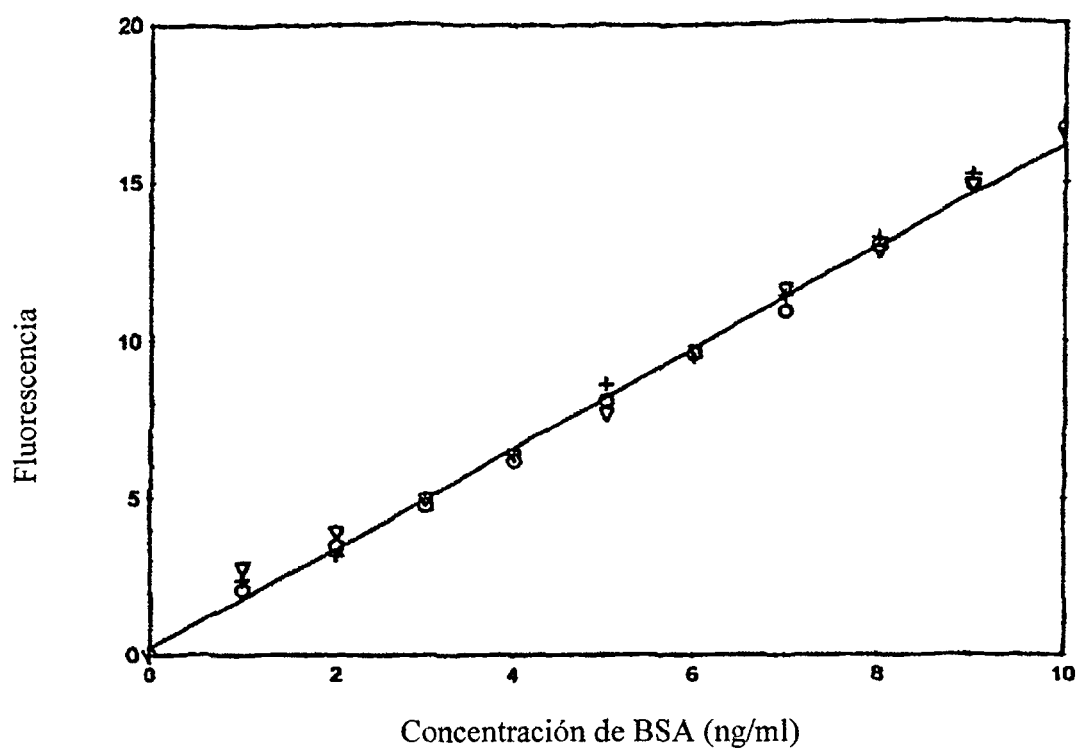


Figura 3