



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 989**

51 Int. Cl.:

**C09K 11/06** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**C09B 23/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99915319 .0**

96 Fecha de presentación : **07.04.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1078023**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

54 Título: **Compuestos luminiscentes.**

30 Prioridad: **08.04.1998 DE 198 15 659**  
**01.05.1998 US 83820 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2011**

73 Titular/es: **LUMINEX CORPORATION**  
**12212 Technology Boulevard**  
**Austin, Texas 78727, US**

72 Inventor/es: **Terpetschnig, Ewald A.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 989 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

### Campo de la invención

La invención se refiere a compuestos luminiscentes basados en ácido escuárico.

5

### Antecedentes de la invención

Un compuesto luminiscente, o luminóforo, es un compuesto que emite luz. A su vez, un procedimiento de luminiscencia es un procedimiento que implica detectar luz emitida por un luminóforo, y que usa propiedades de esa luz para comprender propiedades del luminóforo y su entorno. Los procedimientos de luminiscencia pueden estar basados en la quimiluminiscencia y/o fotoluminiscencia, entre otros, y se pueden usar en espectroscopia, microscopía, inmunoensayos, y otros campos.

La fotoluminiscencia es un tipo particular de luminiscencia que implica la absorción y posterior reemisión de luz. En la fotoluminiscencia, se excita un luminóforo desde un estado base de baja energía a un estado excitado de más alta energía por absorción de un fotón de luz. La energía asociada con esta transición se pierde posteriormente mediante uno o varios mecanismos, incluida la producción de un fotón por fluorescencia o fosforescencia.

La fotoluminiscencia se puede caracterizar por varios parámetros, incluidos el coeficiente de extinción, el espectro de excitación y el de emisión, el desplazamiento de Stokes, el tiempo de vida de luminiscencia y el rendimiento cuántico. Un coeficiente de extinción es una medida dependiente de la longitud de onda de la fuerza absorbente de un luminóforo. Un espectro de excitación es la dependencia de la intensidad de emisión después de la longitud de onda de excitación, medida a una longitud de onda de emisión individual constante. Un espectro de emisión es la distribución de la longitud de onda de emisión medida después de excitación con una longitud de onda de emisión individual constante. Un desplazamiento de Stokes es la diferencia de longitudes de onda entre el máximo del espectro de emisión y el máximo del espectro de absorción. Un tiempo de vida de la luminiscencia es el tiempo medio en el que un luminóforo está en estado excitado antes de retornar al estado de base. Un rendimiento cuántico es la relación del número de fotones emitidos al número de fotones absorbidos por un luminóforo.

Los procedimientos de luminiscencia pueden ser influidos por el coeficiente de extinción, los espectros de excitación y emisión, el desplazamiento de Stokes y el rendimiento cuántico, entre otros, y pueden implicar la caracterización de la intensidad de fluorescencia, la polarización de fluorescencia (FP), la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), el tiempo de tiempo de vida de fluorescencia (FLT), la fluorescencia total de la

35

reflexión interna (TIRF), la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), la recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP) y sus análogos de fluorescencia, entre otros.

5 Los procedimientos de luminiscencia tienen varias características potenciales significativas. Primero, los procedimientos de luminiscencia pueden ser muy sensibles porque los detectores modernos, tales como tubos fotomultiplicadores (PMT) y dispositivos acoplados a carga (CCD), pueden detectar muy bajos niveles de luz. Segundo, los procedimientos de luminiscencia pueden ser muy selectivos porque la señal de luminiscencia puede proceder casi exclusivamente del luminóforo.

10 A pesar de estas capacidades potenciales, los procedimientos de luminiscencia adolecen de varios inconvenientes, de los que al menos algunos se refieren al luminóforo. Por ejemplo, el luminóforo puede tener un coeficiente de extinción y/o un rendimiento cuántico que es demasiado bajo para permitir la detección de una cantidad adecuada de luz. El luminóforo también puede tener un desplazamiento de Stokes demasiado bajo para poder detectar la luz  
15 de emisión sin detección significativa de luz de excitación. Los luminóforos pueden tener también un espectro de excitación que no permite ser excitador por fuentes de luz de longitud de onda limitada, tales como los láseres comunes y las lámparas de arco. El luminóforo también puede ser inestable, por lo que se blanquea fácilmente y se vuelve no luminiscente. También puede tener el luminóforo un espectro de excitación y/o emisión que se solapa con la  
20 bien conocida autoluminiscencia de muestras biológicas y otras; tal autoluminiscencia es particularmente significativa a longitudes de onda por debajo de 600 nm. El luminóforo también puede ser caro, especialmente si es difícil de fabricar.

25 Terpetschnig y otros, Anal. Biochem. 217, 197-204 (q1987) dan a conocer la síntesis y las características de fluorescencia de un éster de escuaraína-N-hidroxisuccinimida y un éster de sulfobutilescuraína-N-hidroxisuccinimida:

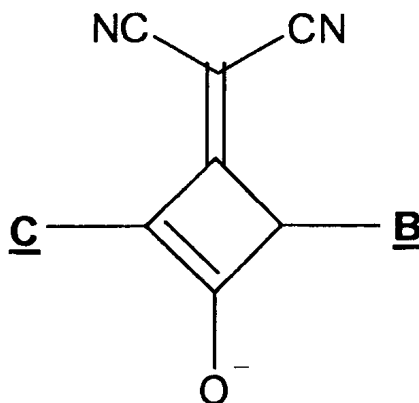
El documento WO 96/41144 describe componentes marcadores que comprenden un resto fluoróforo acoplado a uno o varios restos de polioxihidrocarbilo. Los colorantes de escuarilio se mencionan como posibles fluoróforos y en la Fig. 7v se ejemplifica un compuesto de escuarilio.

30 Se remite al lector de esta patente a las publicaciones siguientes JOSEPH R. LAKOWICZ, PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (1983), RICHARD J. LEWIS SR, HAWLEY'S CONDENSED CHEMICAL DICTIONARY (12<sup>a</sup>. Ed., 1993).

Sumario de la invención

La invención proporciona compuestos fotoluminiscentes y procedimientos de síntesis y uso de compuestos fotoluminiscentes, entre otros.

Generalmente, los compuestos se refieren a la estructura siguiente:

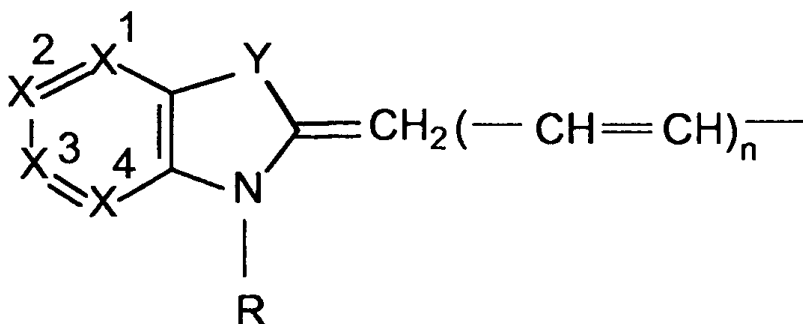


5

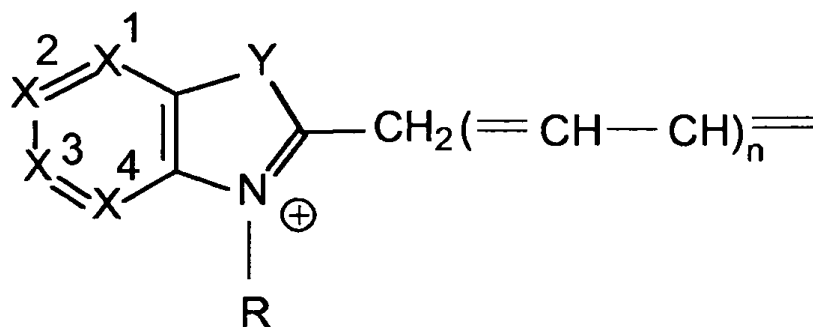
en la que:

(a) cada uno de B y C se selecciona entre el grupo constituido por  $W^1$  y  $W^2$ , siendo  $W^1$  y  $W^2$ :

$W^1$



$W^2$



- (b) uno de B y C es  $W^1$  y el otro de B y C es  $W^2$ ;
- (c) n se selecciona independientemente para cada uno de B y C entre el grupo constituido por 0, 1 y 2;
- (d) Y se selecciona independientemente para cada uno de B y C entre el grupo constituido por O, S, Se, Te,  $N-R^h$  y  $C(R^i)(R^j)$ , seleccionándose  $R^h$  entre el grupo constituido por H, grupos alifáticos, grupos alicíclicos y grupos aromáticos, y seleccionándose cada uno de  $R^i$  y  $R^j$  entre los grupos alifáticos;
- (e) R se selecciona independientemente para cada uno de B y C entre el grupo constituido por H, grupos alifáticos, grupos alicíclicos y grupos aromáticos, y
- (f) cada uno de  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  es selecciona independientemente para cada B y C entre el grupo constituido por N, O, S y  $C-R^k$ , seleccionándose  $R^k$  entre el grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, grupos alifáticos, grupos alicíclicos, grupos aromáticos y partes de un ciclo aromático o heterocíclico condensado sustituido;
- estando asociado el compuesto fotoluminiscente covalentemente o no covalentemente con un vehículo que es una perla.

En algunas realizaciones, el compuesto incluye como mínimo un S. En otras realizaciones, el compuesto incluye como mínimo un heteroátomo en  $X^1$  a través de  $X^4$  de  $W^1$  o  $W^2$ . En otras realizaciones más, el compuesto incluye un vehículo. Generalmente, los procedimientos se refieren al uso de compuestos fotoluminiscentes, descritos antes.

La naturaleza de la invención se entenderá más fácilmente después de considerar los dibujos, las estructuras químicas y la descripción detallada de la invención que se exponen seguidamente.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra los espectros de excitación (línea punteada) y de emisión (línea continua) para (13)-HSA en solución salina tamponada (PBS).

#### Abreviaturas

En esta solicitud se pueden usar, entre otras, las abreviaturas siguientes:

BSA	albúmina de suero bovino
Bu	butilo
DCC	diciclohexilcarbodiimida
DMF	dimetilformamida
D/P	relación de colorante a proteína
Et	etilo

	g	gramos
	h	horas
	hSA	albúmina de suero humano
	HCG	gonadotropina coriónica humana
5	l	litros
	m	mili ( $10^{-3}$ )
	M	molar
	Me	metilo
	mol	moles
10	p.f.	punto de fusión
	n	nano ( $10^{-9}$ )
	NHS	N-hidroxisuccinimida
	NIR	región del infrarrojo próximo
	PBS	solución salina tamponada
15	Prop	propilo
	TMS	tetrametilsilano
	TSTU	tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil(succinimido)uronio
	$\mu$	micro ( $10^{-6}$ )

## 20 Descripción detallada de la invención

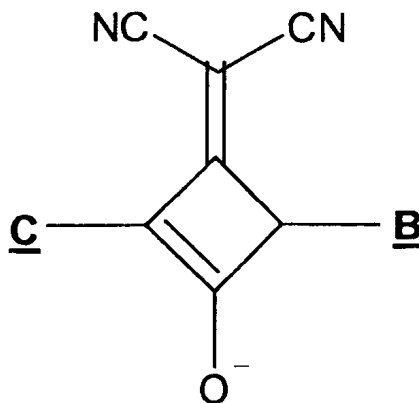
La invención se refiere en general a compuestos fotoluminiscentes y a procedimientos de uso de tales compuestos. Estos compuestos fotoluminiscentes pueden ser útiles, tanto en forma libre o condensada, como sondas, marcadores y/o indicadores. Esta utilidad puede reflejar en parte la intensificación de una o varias de las características siguientes: rendimiento cuántico, desplazamiento de Stokes, coeficientes de extinción, y fotoestabilidad. Esta utilidad también puede reflejar los espectros de excitación y emisión en regiones relativamente inaccesibles del espectro, incluidas las regiones del rojo e infrarrojo próximo.

El resto de la discusión incluye (1) una perspectiva de las estructuras, (2) una perspectiva de los procedimientos de síntesis y (3) una serie de ejemplos ilustrativos.

30

### Perspectiva de las estructuras

Los compuestos fotoluminiscentes y sus precursores sintéticos comprenden generalmente la estructura siguiente:



Los diversos símbolos tienen los significados previamente indicados.

5 Compuestos fotoluminiscentes. En los compuestos fotoluminiscentes, B y C se escogen entre  $W^1$  y  $W^2$ , uno de B y C es  $W^1$  y uno de B y C es  $W^2$ .

Otras características de los compuestos se han descrito previamente.

10 Grupos vehículo. Los compuestos fotoluminiscentes de la invención están asociados covalentemente o no covalentemente con un vehículo que es una perla. La asociación covalente puede realizarse mediante varios mecanismos, incluido un grupo reactivo, y puede implicar un espaciador para separar del vehículo el compuesto fotoluminiscente o el precursor. La asociación no covalente también se puede realizar mediante varios mecanismos, incluida la incorporación del compuesto fotoluminiscente o el precursor en o a una matriz, tal como una perla, o por interacciones no específicas tales como enlace de hidrógeno, enlace iónico o interacciones hidrófobas.

15 Entre los grupos alicíclicos están incluidos grupos de compuestos orgánicos caracterizados por el ordenamiento de átomos de carbono en estructuras de anillos cerrados que en ocasiones semejan barcas, sillas o incluso jaulas de pájaro. Estos compuestos tienen propiedades que se asemejan a las de compuestos alifáticos y no se han de confundir con compuestos aromáticos que tienen el anillo hexagonal del benceno. Los compuestos alicíclicos comprenden tres subgrupos: (1) cicloparafinas (saturadas), (2) cicloolefinas (insaturadas con dos o más dobles enlaces) y (3) cicloacetilenos (ciclitas) con un triple enlace. Las cicloparafinas mejor conocidas (denominadas a veces naftenos) son ciclopropano, ciclohexano y ciclopenteno; de las cicloolefinas son típicas ciclopentadieno y ciclooctatetraeno. La mayoría de los compuestos alicíclicos derivan de petróleo o alquitrán de carbón, y muchos pueden sintetizarse por diversos procedimientos.

Entre los grupos alifáticos figuran grupos de compuestos orgánicos caracterizados por un ordenamiento en cadena lineal o ramificada de los átomos de carbono constitutivos. Los hidrocarburos alifáticos comprenden tres subgrupos: (1) parafinas (alcanos), que son saturadas y comparativamente no reactivas, (2) olefinas (alquenos o alcadienos), que son insaturadas y bastante reactivas y (3) acetilenos (alquinos), que contienen un triple enlace y son muy reactivos. En estructuras complejas, las cadenas pueden ser ramificadas o reticuladas.

Los grupos aromáticos incluyen grupos de hidrocarburos cíclicos insaturados que contienen uno o varios anillos. Un grupo aromático típico es el benceno, que tiene un anillo de 6 carbonos que contiene tres dobles enlaces. La mayoría de los grupos aromáticos son muy reactivos y químicamente versátiles. La mayoría de los aromáticos deriva de petróleo y alquitrán de carbón. Algunos compuestos cíclicos de 5 miembros, tales como el grupo furano (heterocíclico), son análogos de compuestos aromáticos.

Entre los anillos heterocíclicos figuran estructuras de anillo cerrado, usualmente de 5 o 6 miembros, en las que uno o varios de los átomos del anillo es un elemento que no es carbono, por ejemplo, azufre, nitrógeno, etc. Entre los ejemplos figuran piridina, pirrol, furano, tiofeno y purina.

#### Perspectiva de la síntesis y caracterización

Típicamente, la síntesis de los compuestos fotoluminiscentes de acuerdo con la presente invención se realiza mediante reacción multietapa a partir de la síntesis de una base metileno. La síntesis de bases adecuadas puede efectuarse basándose en procedimientos de la bibliografía o en procedimientos nuevos. Generalmente, las propiedades espectrales de los compuestos fotoluminiscentes, incluida la longitud de onda de excitación y emisión, dependen mucho del tipo de la base metileno usada. Entre los típicos materiales de partida figuran benzoindoles, benzoselenoles, benzooxazoles, benzoimidazoles, etc., y ácido escuárico. El ácido escuárico es un ácido dibásico que experimenta una serie de reacciones de sustitución nucleófilas con diversos reactivos, incluidas aminas, fenoles, y compuestos CH-ácidos tales como 1,2,3,3-tetrametil-benzoindol. El puente de escuaraína en los compuestos resultantes estabiliza la cadena conjugada y desplaza la longitud de onda de excitación y emisión de estos colorantes al rojo en comparación con colorantes de base cianina. En particular, el intercambio de oxígeno en el resto de escuaraína con una funcionalidad metileno ( $=CR_2$ ) se ve aquí que es la ruta a nuevos colorantes del grupo escuaraína con útiles propiedades de fluorescencia.

En los ejemplos que siguen a esta sección, se presentan la síntesis y la caracterización espectral de varios marcadores fluorescentes de longitud de onda larga basados en colorantes de escuaraína, incluidas algunas versiones reactivas. Estos colorantes pueden incluir un



cromóforo de tipo cianina y un puente escuarato. Para lograr solubilidad en agua, en los sistemas de anillo heterocíclico se puede introducir ácido sulfónico u otros grupos y, permitiendo así una unión covalente a proteínas, se pueden sintetizar éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) u otras formas. Para modificar las propiedades espectrales de los colorantes, se sintetizaron versiones sustituidas con dicianometileno de las escuarainas y se ensayaron en cuanto a su uso potencial para marcar biopolímeros. Los marcadores basados en escuaraina presentan rendimientos cuánticos más bajos en agua ( $\phi=0,15$ ) y rendimientos cuánticos muy altos ( $\phi=0,5-0,7$ ) cuando están unidos a biomoléculas. Las longitudes de onda de absorción y emisión pueden sintonizarse por sustitución del anillo de la escuaraina o por introducción de heteroátomos en el resto heterocíclico. Así, las indolenina-escuarainas absorben en torno a 635 a 840 nm en agua y a proximadamente 645 a 650 nm cuando están unidas a proteínas. Los espectros de absorción y emisión de escuarainas de benzotiazolio y benzoselenzolio, por otra parte, están desplazados hacia longitudes de onda más largas. Las longitudes de onda de emisión típicas para tales colorantes de escuaraina están en torno a 680 a 690 nm para colorantes de benzotiazol y a más de 700 nm para derivados de benzoselenzol. Es importante que el desplazamiento de Stokes aumenta en estos colorantes que emiten longitudes de onda más largas, lo que finalmente aumenta la sensibilidad de una medición fluorescente.

Los colorantes resultantes presentan máximos de absorción y emisión a más de 600 nm y su longitud de onda se puede sintonizar cambiando el resto heterocíclico y/o la sustitución en el sistema anular de la escuaraina. El desplazamiento de Stokes de los derivados de metileno de escuarainas simétricas (15) aumenta más de 2,5 veces respecto al desplazamiento de Stokes de las escuarainas análogas que contienen oxígeno (8) y (3b). Además, el reemplazo de C=O por C=C en el ejemplo (15) da por resultado un desplazamiento batocrómico de ambas, las propiedades de absorción y emisión de estos colorantes. Se puede lograr un mayor aumento del desplazamiento de Stokes introduciendo asimetría en la molécula. Así, se espera que las versiones asimétricas (15) tengan incluso mayores desplazamientos de Stokes.

La sustitución de un oxígeno en el puente cuadrado central con reactivos CH-ácidos, por ejemplo, dicianometano,  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)-\text{COOH}$  o  $\text{ROOC}-(\text{CH}_2)-\text{CN}$  conduce al grupo de derivados de metilenesquaraina luminiscentes. En comparación con las escuarainas básicas, estos compuestos tienen propiedades de excitación y emisión desplazadas hacia el rojo y mayores desplazamientos de Stokes. Los máximos de absorción y emisión de un colorante reactivo representativo (15) (ejemplo 7) se encontró que eran de 667 nm y 685 nm en PBS, respectivamente.

El ejemplo 8 describe rutas de síntesis a colorantes asimétricos de tioescuaraina y metilenesquaraína. Los compuestos de esquaraína de este ejemplo no forman parte de la invención según se reivindica. Los intermediarios clave para este subgrupo de esquaraína son tioescuaraina monosustituída y derivados de metilenesquaraína, que se sintetizan haciendo reaccionar la sal disódica del ácido 1,3-ditioesquárico (2c) o el esquarato de 4-cianometilen-2,3-dibutilo (2d) con 1 equivalente de indolenina (1a). Posteriormente se hace reaccionar el intermedio con un equivalente de una base metileno diferente. La síntesis de colorantes de esquaraína asimétricos permite el acceso a colorantes de esquaraína reactiva monofuncional (Esquema 1). Tales colorantes muestran un comportamiento marcador mejorado a causa de una reticulación reducida con proteínas.

El ejemplo 9 muestra estructuras de colorantes basados en tioescuaraina y metilenesquaraína que demuestran además la variedad de estructuras que se pueden sintetizar a partir de esta invención. Sólo los compuestos de dicianometilen-esquaraína de este ejemplo forman parte de la invención según se reivindica. La mayor parte de las estructuras representativas está basada en colorantes reactivos solubles en agua que presentan diferentes configuraciones de sustitución en el puente central. Dos de las estructuras contienen uniones de fosforamidita para el acoplamiento directo usado en la síntesis de ADN o ARN en soporte sólido. Para la síntesis de fosforamiditas se pueden usar versiones sulfonadas y no sulfonadas de colorantes de esquaraína. La unión de fosforamidita se puede incorporar en las bases heterocíclicas o se puede unir al anillo central cuadrado mediante activación de una función carboxilcianometileno a un éster de NHS y haciendo que reaccione con un grupo espaciador aminoalcohol. La función hidroxílica introducida se convierte luego en una fosforamidita por procedimientos estándar.

## EJEMPLO 1

### Síntesis de precursores

Esta sección describe la síntesis de varios precursores. Usando procedimientos de la bibliografía, se sintetizaron ácido p-hidrazinobencenosulfónico (Illy y otros, J. Org. Chem. 33, 4283-4285 (1968)), sal potásica del ácido 1-(ε-carboxipentil)-2,3,3,3-timetilindolenio-5-sulfónico (1a), sal potásica del ácido 2,3,3-trimetilindol-5-sulfónico (Mujumdar y otros, Bioconj. Chem. 4, 105-111 (1993)) (1b) y 1,2,3,3-tetrametilindoleninio-5-sulfonato (1c). Se sintetizaron la sal disódica del ácido 1,3-ditioesquárico (2c) y dicianometilendimetilesquarato (2d) de acuerdo con G. Seitz y otros, Chem. Ber. 112, 990-999 (1979) y B. Gerech y otros, Chem. Ber. 117, 2714-2729 (1984), respectivamente.

Preparación de la sal potásica del ácido 1-( $\epsilon$ -carboxipentil)-2,3,3-trimetilindolenio-5-sulfónico (1a)

Ácido p-hidrazinobencenosulfónico

5 Se añadieron 33 g de carbonato sódico a una suspensión de 104 g (0,6 mol) de ácido p-aminobencenosulfónico en 400 ml de agua caliente. La solución se enfrió a 5°C en baño de hielo y se añadieron lentamente, bajo agitación rápida, 70 g de ácido sulfúrico concentrado. Luego se añadió con enfriamiento una solución de 42 g de nitrito sódico en 100 ml de agua. Se formó un precipitado amarillo claro de compuesto diazo, que se filtró, se lavó con agua pero no se secó.

10 El compuesto diazo húmedo se añadió bajo agitación y enfriamiento (5°C) a una solución de 170 g de sulfito sódico en 500 ml de agua. La solución, que tomó un color naranja, se agitó bajo enfriamiento durante 1 h y luego se calentó a reflujo. Finalmente se añadieron 400 ml de ácido clorhídrico conc. La solución tomó un color amarillo y el producto precipitó como un sólido blanco. Para decoloración completa se añadieron 1-2 g de polvo de zinc. La mezcla de reacción se enfrió durante la noche y el precipitado se separó por filtración, se lavó con agua y se secó en estufa a 100°C.

Rendimiento: 96 g (85%), polvo blanco, p.f. = 286°C (bibliog. 285°C);  $R_f$  0,95 (RP-18, agua:MeOH 2:1)

20 Preparación de la sal potásica del ácido 2,3,3-trimetilindol-5-sulfónico (1b)

Se agitaron durante una h a temperatura ambiente en 100 ml de ácido acético glacial 18,2 g (0,12 mol) de ácido p-hidrazinobencenosulfónico y 14,8 g (0,17 mol) de isopropilmetilcetona. La mezcla se mantuvo luego a reflujo durante 4 h. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y el precipitado sólido de color rosa resultante se separó por filtración y se lavó con éter.

El precipitado se disolvió en metanol y se añadió una solución concentrada de hidróxido potásico en 2-propanol hasta que precipitó completamente un sólido amarillo. Se separó el precipitado por filtración, se lavó con éter y se secó en desecador sobre  $P_2O_5$ .

30 Rendimiento: 20,4 g (71%), polvo blancuzco, p.f. 275°C,  $R_f$  0,40 (gel de sílice, isopropanol:agua: amoniaco 9:0,5:1).

Sal potásica del ácido 1-( $\epsilon$ -carboxipentil)-2,3,3-trimetilindolenio-5-sulfónico (1a)

35 Se mantuvieron a reflujo en 100 ml de 1,2-diclorobenceno durante 12 h bajo atmósfera de nitrógeno 15,9 g (57 mmol) de la sal potásica del ácido 2,3,3-timetilindolenio-5-sulfónico y

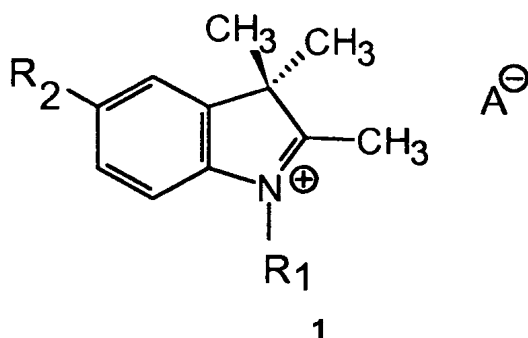
12,9 g (66 mmol) de ácido 6-bromohexanoico. La solución se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado rosa se separó por filtración, se lavó con cloroformo y se secó.

Rendimiento: 15,8 g (58%), polvo rosa,  $R_f$  0,75 (RP-18, MeOH:agua 2:1).

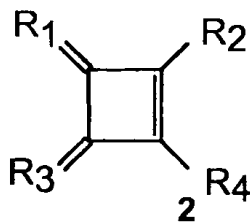
5 Síntesis de 1,2,3,3-tetrametilindoleninio-5-sulfonato (1c)

Se pusieron en suspensión 1,1 g de 2,3,3-trimetilindoleninio-5-sulfonato en 30 ml de yoduro de metilo. La mezcla de reacción se calentó a ebullición durante 25 h en tubo cerrado. Después de enfriar la mezcla, se decantó el exceso de yoduro de metilo y el residuo se puso en suspensión en 50 ml de acetona. Se filtró la solución y el residuo se secó en desecador sobre  $\text{CaCl}_2$ . El polvo amarillo claro resultante se usó sin purificarlo más.

Rendimiento: 90%, polvo amarillo claro.



1	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	A <sup>-</sup>
a	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COOH	SO <sub>3</sub> K	I
b	-	-	-
c	CH <sub>3</sub>	SO <sub>3</sub> K	I



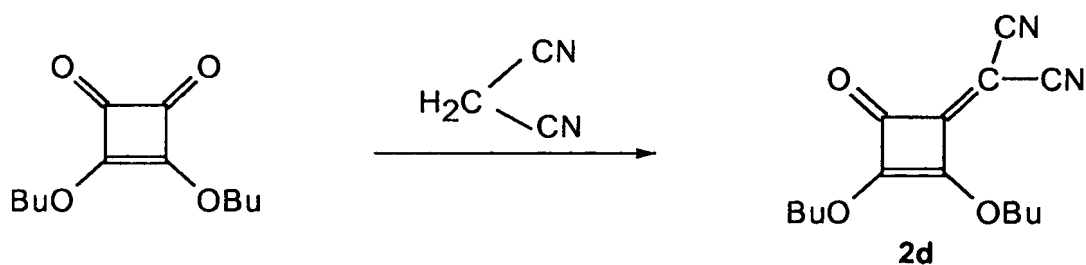
2	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
a	O	O	OH	OH
b	O	O	OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
c	S	O	S- Na <sup>+</sup>	O- Na <sup>+</sup>
d	O	CH <sub>2</sub> (CN) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

### EJEMPLO 2

5 Síntesis de 2,4-bis[N-(butoxicarbonilpentil)-3,3-dimetil-5-sulfo-2-indoliniliden metil ciclobuten-  
diilio-3-dicianometilen-1-oxolato (15)

3-dicianometilen-2,4-dibutil-escurato (2d)

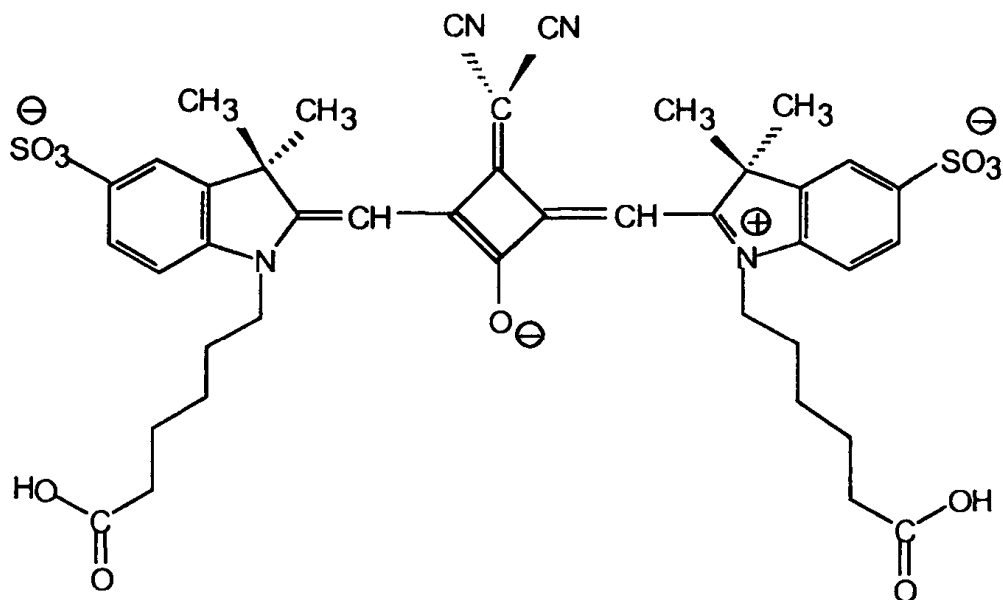
10 Se preparó 3-diciano-2,4-dibutil-escurato (2d) de acuerdo con Gerecht y otros (1984)



15 Se disolvieron en 40 ml de THF 2,16 ml (10 mmol) de dibutiléster del ácido escuárico. Se añadieron bajo agitación 660 mg (10 mmol) de malonodinitrilo. Se añadió luego una solución de 1,64 ml de trietilamina en 3 ml de THF y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y quedó un aceite de color amarillo-

pardo. El producto en bruto se purificó por cromatografía múltiple de líquidos (MPLC) usando gel de sílice como fase estacionaria y metanol como eluyente.

Rendimiento: 173 mg (63%) de (2d).



5

15

Se mantuvieron a reflujo durante 4 h 472 mg de la sal potásica del ácido 1-( $\epsilon$ -carboxipentil)-2,3,3-trimetilindolenio-5-sulfónico (1a) y 137 mg del éster dibutílico del ácido malononitriloescuárico (2d) en 25 ml de butanol:tolueno (1:1, v/v) usando una trampa Dean-Stark. Después de enfriada la mezcla a temperatura ambiente, se eliminaron los disolventes en vacío y el producto en bruto se trituró con éter y se secó. El producto en bruto se purificó por cromatografía preparativa en capa fina en placas de vidrio RP-18 usando una mezcla de metanol:agua (2:1 v/v) como eluyente. Se recogió la banda azul-verde con un  $R_f$  de 0,55.

Rendimiento: 32%. FAB-EMFAB calculado para  $C_{41}H_{44}N_4O_{11}S_2K_2$  ( $M^+$ ) 832,9, hallado 633,2. IR (KBr):  $2100\text{ cm}^{-1}$  (CN). RMN  $^1\text{H}$  ( $D_2O$ ):  $\delta$  8,00 (2H, s), 7,90 (2H, d), 7,75 (2H, d), -CH= está intercambiado, 4,45 (4H, t), 2,10 (4H, t), 1,85 (4H, m), 1,55 (4H, m), 1,45 (12H, s), 1,35 (4H, m);  $\lambda_{\text{max}}(\text{abs}) = 667\text{ nm}$  (PBS),  $\lambda_{\text{max}}(\text{em}) = 685\text{ nm}$  (PBS) (4%),  $\lambda_{\text{max}}(\text{abs}) = 687\text{ nm}$  (PBS+HSA),  $\lambda_{\text{max}}(\text{em}) = 704\text{ nm}$  (PBS+HSA), (8%),  $\epsilon = 110.000\text{ l/mol.cm}$  ( $H_2=$ ).

### 20 EJEMPLO 3

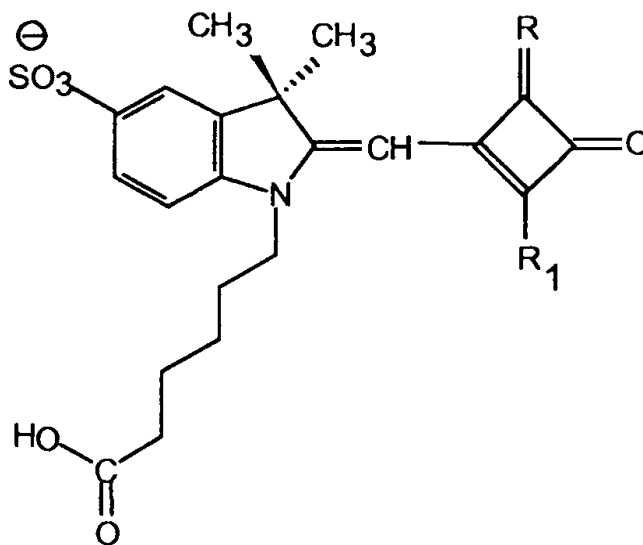
Los compuestos de tioescuaraina de este ejemplo no forman parte de la invención según se reivindica, pero se retienen como información base útil.

Tioescuaraina y dicianometilenescuaraínas asimétricasSíntesis de tioescuaraina monosustituida y derivados de dicianometilenescuaraína

5 Los siguientes compuestos son intermediarios importantes para la síntesis de colorantes asimétricos de escuaraina y se pueden sintetizar usando como materiales de partida derivados del ácido escuárico o de éster escuárico. Seguidamente se da un procedimiento general para la síntesis de dos clases de análogos asimétricos de escuaraina.

10 Se disolvió en 10 ml de etanol que contenía 100  $\mu$ l de trietilamina 1 mmol de 1-( $\epsilon$ -carboxipentanyl)-2,3,3-trimetilindolenio-5-sulfonato. La mezcla se calentó a 40°C y se añadieron en porciones pequeñas 1,1 mmol de éster dibutílico del ácido dicianometilenescuárico (2d) o de sal disódica del ácido 1,3-ditioescuárico (2c). La mezcla de reacción se calentó luego a 60°C y se agitó durante 4 h. Después de enfriada la mezcla a temperatura ambiente, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se volvió a disolver en etanol, se añadieron 5 ml de HCl 0,1 M y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 10 min. Después de enfriar, se eliminaron los disolventes y el residuo se lavó varias veces con éter o cloroformo.

15



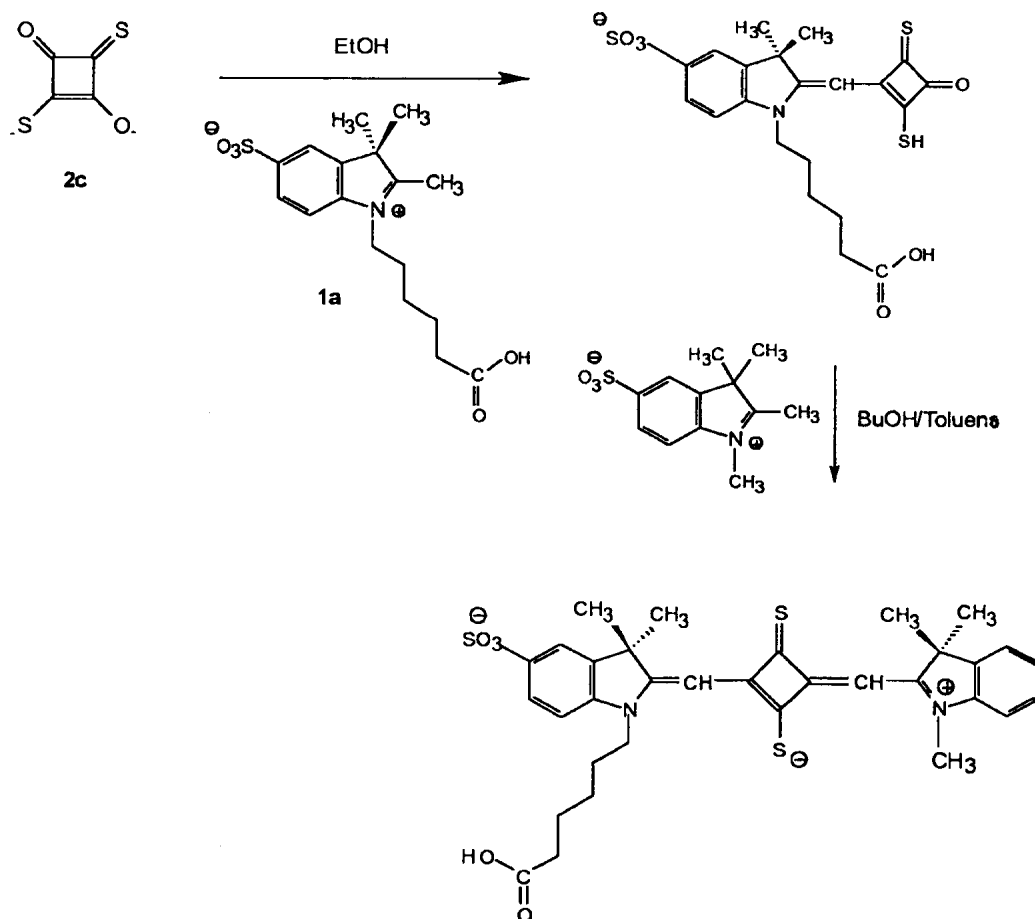
Derivado de escuaraina	R	R1
Diciano-metileno	C(CN) <sub>2</sub>	OH
Ditio-	S	SH

Procedimiento general de síntesis para colorantes asimétricos de tioescuaraina y metilenesquaraína

Se calentaron a reflujo los intermedios anteriores con 1 mmol de 1,2,3,3-tetrametilindoleninio-5-sulfonato en una mezcla de butanol:tolueno (1:1 v/v) usando una trampa Dean-Stark. Después de enfriar se eliminaron los disolventes a presión reducida. El producto se puede purificar por cromatografía preparativa en capa fina (RP-18F<sub>25</sub>4S) usando como eluyente metanol:agua (2:1 v/v).

Rendimiento: 25-30% de compuesto asimétrico.

10 Esquema de síntesis para un colorante asimétrico de tioescuaraina

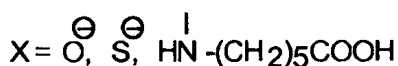
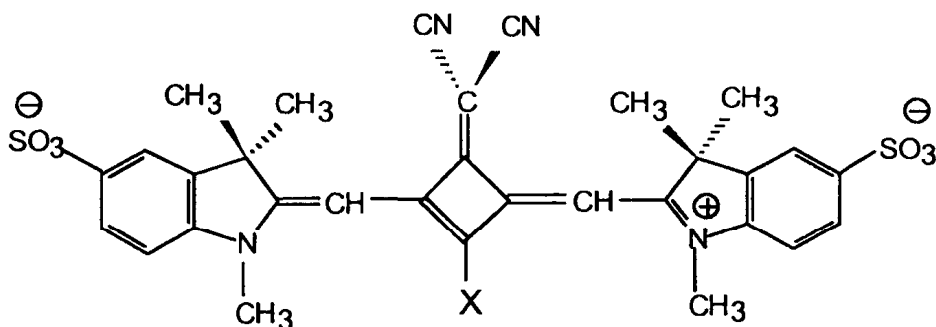
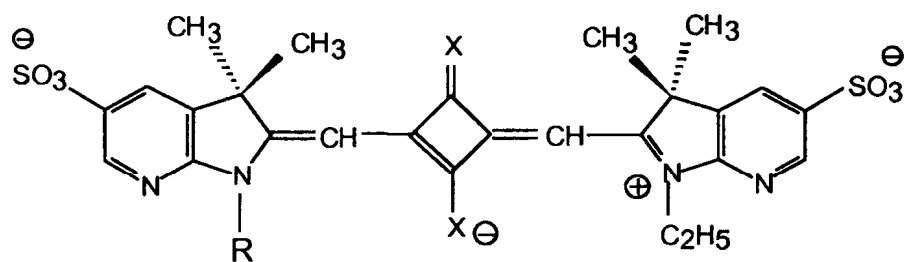




**EJEMPLO 4**

Sólo forman parte de la invención según se reivindica los compuestos de dicianometilenesquaraína de este ejemplo. Los restantes compuestos se conservan como información útil antecedente.

5

Estructuras adicionales de colorantes de tioesquaraína y metilenesquaraína

10

15

El último ejemplo muestra un anillo cuadrado central ( $X = O^-, S^-$ ) convertido de manera que contiene un grupo final reactivo para unión covalente a moléculas vehículo. Para introducir una función amino en un anillo de esquaraína ( $X = O^-, S^-$ ), la esquaraína o esquaraína sustituida se convierte en una versión monoéster ( $X = OMe, OBu$ ) en la que Me es metilo y Bu es butilo. El monoéster se hace reaccionar luego con la amina o un derivado aminoácido para que resulte un derivado amino. Este mecanismo ofrece una ruta conveniente de conversión de un colorante no reactivo de esquaraína en un análogo reactivo.

EJEMPLO 5Procedimientos generales para marcar proteínas y determinación de relaciones de colorante a proteína

5 Las reacciones de marcar proteínas se realizaron usando tampón de bicarbonato 50 mM (pH 9,1). Se preparó una solución madre de 1 mg de colorante en 100  $\mu$ l de DMF anhidra. Se disolvieron 10 mg de proteína en 1 ml de tampón de bicarbonato 100 mM (pH 9,1). Se añadió colorante de la solución madre y la mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente.

10 Se separó colorante no conjugado de las proteínas marcadas usando cromatografía de penetración en gel con columna Sephadex G50 (columna de 0,5 cm x 20 cm) y como eluyente solución tampón de fosfato 22 mM (pH 7,3). La primera banda coloreada contenía el conjugado de colorante-proteína. Una posterior banda azul con un tiempo de retención mucho más alto contenía el colorante libre separado. Se preparó una serie de reacciones de marcación como se ha descrito antes para obtener diferentes relaciones de colorante a proteína. Comparativamente con las formas libres, las formas unidas a proteína de los colorantes presentan cambios definidos en sus propiedades espectrales.

15 Las concentraciones de proteína se determinaron usando el kit de Reactivo de Ensayo de Proteínas BCA de Pierce (Rockford, IL). La relación de colorante a proteína (D/P) da el número de moléculas de colorante unidas covalentemente a la proteína.

Unión covalente de éster de NHS (14) a anti-HSA policlonal

25 Se disolvieron 385  $\mu$ l (5,2 mg/ml) de anti-HSA en 750  $\mu$ l de tampón de bicarbonato (0,1 M, pH 9,0). Se disolvió 1 mg de éster de NHS (14) en 50  $\mu$ l de DMF y se añadió lentamente con agitación a la solución de proteína antes preparada. Después de 20 h de agitación, se separó el conjugado de proteína del colorante libre usando una columna Sephadex G50 y tampón de fosfato (20 mM, pH 7,2). La primera banda azul que se aisló contenía el conjugado marcado.

Conjugación de (14) a HSA

30 Se añadieron lentamente 0,5 mg de (14) en 50  $\mu$ l de DMF a una solución en agitación de 5 mg de HSA en 750  $\mu$ l de tampón de bicarbonato (0,1 M, pH 9,0). La mezcla se agitó durante otras 6 h a temperatura ambiente. La mezcla se dializó frente a un tampón de fosfato (22 mM, pH 7,2) usando una membrana de diálisis (1500 FT, Union Carbide) con corte a 10.000.

35 Análisis:  $\lambda_{\max}$  (abs) = 642 nm (PBS);  $\lambda_{\max}$ (em) = 654 nm (PBS).

Se realizaron reacciones similares usando los otros colorantes reactivos.

Tiempos de extinción de la fluorescencia de diferentes colorantes y sus conjugados

5 La siguiente tabla muestra los tiempos de extinción de la fluorescencia de varios colorantes y sus conjugados. Las condiciones experimentales incluyeron (1) excitación a 600 nm usando laser de colorante de rodamina B, (2) emisión observada a 660 nm usando un filtro de interferencia con paso de banda a 10 nm, y (3) a una temperatura de 20°C.

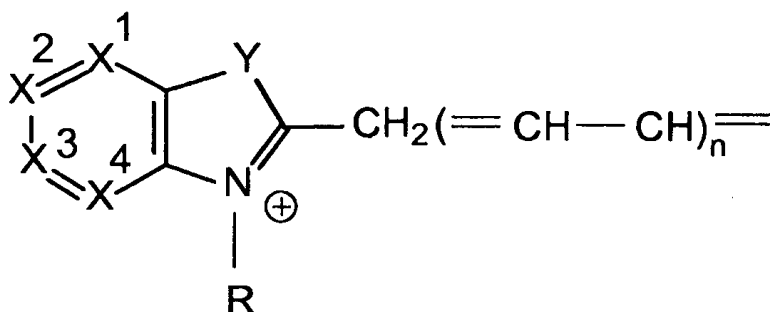
Muestra	Tiempo de extinción, ns	Amplitud	Intensidad fraccionaria	Tiempo de vida media, ns	Chi cuadrado
3a	0,21	0,752	0,496	0,43	3,7
	0,65	0,248	0,504		
4	0,20	0,558	0,286	0,51	3,8
	0,64	0,442	0,714		
3b-HSA	0,18	0,676	0,142	2,26	1,7
	0,96	0,089	0,097		
	3,81	0,253	0,761		
13-HSA	0,011	0,865	0,036	2,44	5,22
	0,768	0,068	0,201		
	2,99	0,067	0,764		
Cy5	1,02	1	1	1,01	2,1
Cy5-hCG	0,16	0,408	0,071	1,33	2,8
	1,41	0,592	0,929		

10 Propiedades espectrales y relaciones colorante a proteína para varios colorantes reactivos de escuaraína y sus conjugados

Se determinaron las propiedades espectrales y relaciones de colorante a proteína para varios colorantes reactivos de escuaraína y sus conjugados. La Figura 1 muestra los espectros de absorción (excitación) y emisión para (13)-HSA en PBS. La tabla siguiente

resume datos para (13)-HSA y otros varios colorantes reactivos de escuaraína y sus conjugados en PBS.

Escuaraína	$\lambda_{\max}(\text{abs}), \text{nm}$	$\lambda_{\text{maz}}(\text{em}), \text{nm}$	$\epsilon, \text{l}(\text{mol}\cdot\text{cm})$	Rend c, %	D/P, mol/mol
3b	635	642	180.000	13	-
3b-HSA	642	653	-	60-70	1
6a	627	647	100.000	3	-
7	634	646	120.000	13	-
7-HSA	635	660	-	50	0,5
13	630	649	66.000	5	-
13-HSA	642	654	-	60ñ-70	0,8
15	667	685	110.000	4	-
15-HSA	685	704	-	n.d.	n.d.



5

#### Descripción de aplicaciones de la invención

Además de los compuestos, la invención proporciona varios procedimientos para usar estos compuestos en diversos formatos de ensayo.

- 10 El ensayo puede ser un ensayo competitivo que incluye un resto de reconocimiento, un partícipe de unión y un analito. Los partícipes de unión y los analitos se pueden seleccionar entre el grupo constituido por biomoléculas, fármacos y polímeros. En algunos formatos de ensayo competitivo, se marcan un compuesto o varios con compuestos fotoluminiscentes de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el asociado de unión puede marcarse con uno de tales
- 15 compuestos fotoluminiscentes y, por la aparición de fluorescencia en una fase líquida del

ensayo, se puede detectar el desplazamiento del compuesto desde un resto de reconocimiento inmovilizado. En otros formatos de ensayo competitivo, se puede usar una enzima inmovilizada para formar un complejo con el sustrato fluoróforo-conjugado.

5 La unión de antagonistas a un receptor se puede ensayar por un procedimiento de unión competitiva en los denominados ensayos de ligando/receptor. En tales ensayos, un antagonista marcado compite con un ligando no marcado por el sitio de unión del receptor. Uno de los partícipes de unión se puede inmovilizar, pero no se ha de inmovilizar necesariamente. Tales ensayos se pueden realizar también en microplacas. La inmovilización se puede lograr mediante unión covalente a la pared del pocillo o a la superficie de las perlas.

10 Otros formatos de ensayo preferidos son los ensayos inmunológicos. Hay varios tipos de ensayos inmunológicos. Ensayos de unión competitivos, en los que antígenos marcados y no marcados compiten por los sitios de unión sobre la superficie de un anticuerpo (material de unión). Típicamente, hay tiempos de incubación requeridos para que haya un tiempo suficiente para equilibrar. Tales ensayos se pueden realizar de modo heterogéneo u homogéneo.

15 Los ensayos de emparedado usan anticuerpos secundarios y se elimina material de unión de acceso del analito mediante una etapa de lavado.

Entre otros tipos de reacciones figuran unión entre avidina y proteína, proteína A e inmunoglobulinas, lectinas y azúcares (por ejemplo, concanavalina A y glucosa).

20 Los compuestos fotoluminiscentes descritos aquí se pueden usar también para secuenciar ácidos nucleicos y péptidos. Por ejemplo, se pueden usar oligonucleótidos marcados por fluorescencia para detectar fragmentos de ADN.

Otras aplicaciones de cebadores de ADN marcados, además de para la secuenciación de ADN, están en los procedimientos de hibridación fluorescente in situ (FISH) y para aplicaciones de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP).

25 Los experimentos de marcación multicolor permiten controlar simultáneamente diferentes parámetros bioquímicos. A este fin, se pueden introducir dos o más fluoróforos en el sistema biológico para informar sobre diferentes funciones bioquímicas. La técnica se puede aplicar a hibridación fluorescente in situ (FISH), secuenciación de ADN, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Una forma de lograr el análisis multicolor es marcar biomoléculas tales como nucleótidos, proteínas o cebadores de ADN con diferentes marcadores fluorescentes y propiedades de fluorescencia definidas. Para marcación multicolor se prefieren fluoróforos con anchuras de banda de emisión estrechas, porque tienen sólo un pequeño solapamiento con los otros colorantes y, por ello, mutuamente están bien separados para que haya una resolución suficiente de la señal. Un trío multicolor adecuado de fluoróforos  
30 incluiría Cy3, TRICT y un compuesto fotoluminiscente según se ha descrito aquí, entre otros.  
35

El uso simultáneo de cebadores de FISH (hibridación fluorescente in situ) en combinación con diferentes fluoróforos es útil para la detección de translocaciones cromosómicas, para mapeado de genes sobre cromosomas y para marcar tumores, para nombrar sólo unas pocas aplicaciones. Una manera de conseguir la detección simultánea de 5 secuencias múltiples es usar la marcación combinatoria. Se pueden visualizar hasta siete diferentes dianas de ADN usando una combinación de cebadores haptenados de ADN (por ejemplo, biotina, digoxigenina o dinitrofenol) con tres conjuntos de fluoróforos distinguibles que muestran emisión en el verde (fluorescente), el rojo (Texas Red) y azul (ácido 7-amino-4-metil-cumarin-3-ácido o Cascade Blue) (Ried y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1388-1392 10 (1992)). Se pueden visualizar tres cebadores de ADN marcados de los tres marcadores fluorescentes, mientras que otros cuatro aparecerán como mezclas de fluoróforos, por ejemplo, el cebador 4 (fluoresceína y rodamina); cebador 5 (fluoresceína y Cascade Blue); cebador 6 (rodamina y Cascade Blue) y cebador 7 (fluoresceína, rodamina y Cascade Blue).

La otra manera es marcar cada cebador de ácido nucleico con un fluoróforo con 15 propiedades espectrales definidas. Se pueden sintetizar conjugados similares de esta invención y usarlos en un enfoque de análisis multisequencial multicolor.

Los compuestos luminiscentes de la invención pueden usarse también para ensayos de exploración en una biblioteca combinatoria de compuestos. Los compuestos se pueden explorar en cuanto a varias características, incluidas su especificidad y aidez a favor de un resto 20 de reconocimiento particular.

Los ensayos de exploración de una biblioteca de compuestos son bien conocidos. Un ensayo de exploración se usa para determinar compuestos que se unen a una molécula diana y por ello crean un cambio de señal que genera un ligando marcado unido a la molécula diana. Tales ensayos permiten explorar compuestos que actúan como agonistas o antagonistas de un 25 receptor o que interrumpen la interacción proteína-proteína. También se pueden usar para detectar hibridación o unión de ADN y/o ARN.

Otra manera de realizar ensayos de exploración está basada en compuestos que influyen sobre la actividad enzimática. A tal fin se podrían usar sustratos de enzima no fluorescentes de la invención para detectar la interacción con el sustrato.

30 También es posible ensayar compuestos que interfieren con proteínas que inhiben la actividad enzimática usando un ensayo electroforético. En tales ensayos, los compuestos más activos impiden la inhibición de enzimas, lo que da por resultado más catálisis enzimática.

Además de los sustratos de enzimas no fluorescentes se pueden usar en tales ensayos sustratos fluorescentes. La escisión del sustrato fluorescente conduce a un cambio de las

propiedades espectrales tales como el máximo de excitación y emisión, lo que permite distinguir entre el fluoróforo libre y el unido.

### Analitos

5 La invención puede usarse para detectar un analito que interacciona con un resto de reconocimiento de manera detectable. Como tal, la invención se puede unir a un resto de reconocimiento que es conocido por los expertos en la técnica. Tales restos de reconocimiento permiten la detección de analitos específicos. Son ejemplos moléculas sensibles al pH o al potasio, por ejemplo, sintetizadas mediante introducción de quelantes de potasio tales como  
10 éteres corona (azacoronas, tiacoronas, etc.). Para detectar las concentraciones iónicas intracelulares se usan frecuentemente sensores de calcio basados en BAPTA (1,2-bis(2-aminofenoxi)etan-N,N,N',N'-tetra-ácido acético) como especie quelante. La combinación de un compuesto de la invención y el BAPTA, resto de unión de calcio, puede conducir a nuevos sensores de Ca absorbentes y emisores de longitud de onda larga que podrían usarse para la  
15 determinación de concentraciones intra y extracelulares de calcio (Akkaya y otros, Tetrahedron Lett. 38, 4513-4516 (1997)).

### Procedimientos de fluorescencia

Estos compuestos de la nueva invención se pueden detectar aplicando procedimientos  
20 fluorescentes basados en la intensidad, comúnmente usados. Se sabe que los colorantes de escuaraina tienen tiempos de vida en el intervalo de cientos de ps a unos pocos ns (véase tabla). El tiempo de vida de nanosegundos y la longitud de onda larga de absorción y emisión de estos colorantes cuando se unen a proteínas permitiría medirlos con una instrumentación barata usando diodos de láser para excitación y fotodiodos de avalancha para detección. Son  
25 ensayos típicos basados en la medición del tiempo de vida de la fluorescencia como parámetro los ensayos FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). La unión entre una especie marcada dadora fluorescente (típicamente un antígeno) y una especie marcada aceptora fluorescente está acompañada por un cambio en la intensidad y el tiempo de vida de la fluorescencia. El tiempo de vida se puede medir usando procedimientos basados en la  
30 intensidad o modulación de fase (J.R. LAKOWITZ, PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (1983)).

Los colorantes de escuaraina presentan una polarización intrínseca alta en ausencia de movimiento rotatorio, lo que los hace útiles como marcadores en ensayos de polarización de fluorescencia (FP). Los inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPI) se usan  
35 ampliamente para cuantificar antígenos de bajo peso molecular. Los ensayos están basados en

medidas de la polarización de antígenos con sondas fluorescentes. El requerimiento de sondas de polarización usadas en FPI es que la emisión del antígeno marcado no unido se pueda despolarizar y aumentar después de unirse al anticuerpo. En tales ensayos de unión se pueden usar especies de bajo peso molecular marcadas con los compuestos de la invención, y la concentración desconocida del analito se puede determinar por el cambio de la emisión polarizada de la molécula del marcador fluorescente.

Los materiales, procedimientos y aplicaciones de la invención se ejemplifican con la descripción siguiente de la síntesis y propiedades espectrales de los compuestos.

Se ha indicado ya la síntesis y la caracterización espectral de un derivado de escuaraína para unión covalente a biomoléculas. Las escuaraínas, que son derivados 1,3-disustituídos del ácido escuárico, tienen altos coeficientes de absorción ( $\epsilon > 200.000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en la región del rojo, presentan una alta fotoestabilidad y permiten la introducción de grupos funcionales reactivos tales como ésteres de NSH. Estos colorantes presentan buenos rendimientos cuánticos en la unión a proteínas. El carácter hidrófilo de los colorantes se puede mejorar introduciendo grupos ácido sulfónico.

Las ventajas de la detección por fluorescencia con excitación a una longitud de onda alta son la aminorada autofluorescencia de las células y tejidos y el uso de fuentes baratas de luz láser operando a 635, 645 y 650 nm. La autofluorescencia de muestras biológicas disminuye al crecer la longitud de onda, en particular más allá de 600 nm. Sólo existen unas pocas sondas que absorben en la región del rojo o el infrarrojo próximo (NIR) e incluso son menos las disponibles en forma reactiva. Se pueden usar funcionalidades tales como isocianato y ésteres de N-hidrosuccinimida y grupos yodoacetamida y maleiimida reactivos frente a tiol para unir covalentemente moléculas de marcador a fármacos, ADN, anticuerpos y polímeros sintéticos.

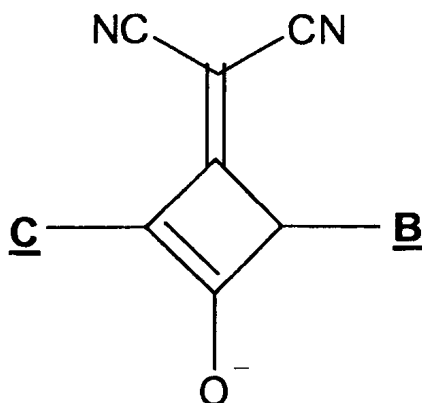
Aunque la invención se ha descrito en formas preferidas, sus realizaciones específicas según se han dado a conocer e ilustrado aquí no han de considerarse en sentido limitativo porque son posibles numerosas variaciones.



## REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende un compuesto fotoluminiscente, compuesto fotoluminiscente que tiene la estructura:

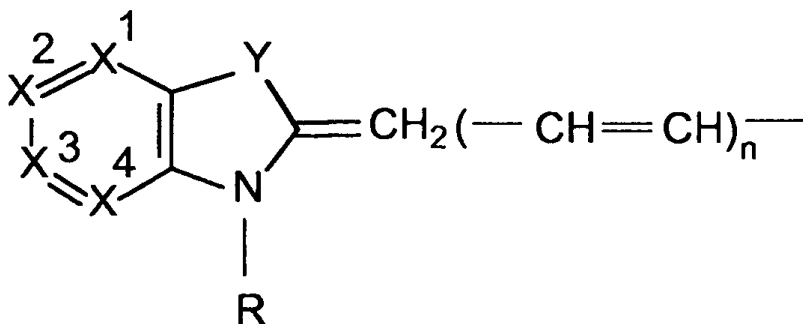
5



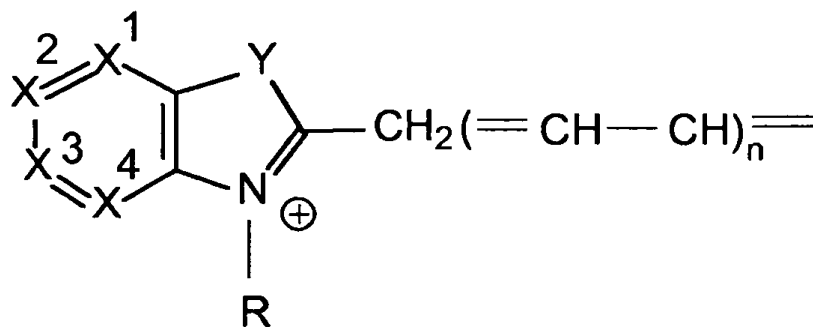
en la que:

(a) cada uno de B y C se selecciona entre el grupo constituido por  $W^1$  y  $W^2$ , siendo  $W^1$  y  $W^2$

$W^1$



$W^2$



- (b) uno de B y C es  $W^1$  y el otro de B y C es  $W^2$ ,
- (c) n se selecciona independientemente para cada uno de B y C entre el grupo constituido por 0, 1 y 2;
- 5 (d) Y se selecciona independientemente para cada uno de B y C entre el grupo constituido por O, S, Se, Te,  $N-R^h$  y  $C(R^i)(R^j)$ , seleccionándose  $R^h$  entre el grupo constituido por H, grupos alifáticos, grupos alicíclicos y grupos aromáticos, y seleccionándose cada uno de  $R^i$  y  $R^j$  entre los grupos alifáticos;
- (e) R se selecciona independientemente para cada uno de B y C entre el grupo constituido por H, grupos alifáticos, grupos alicíclicos y grupos aromáticos, y
- 10 (f) cada uno de  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  es selecciona independientemente para cada B y C entre el grupo constituido por N, O, S y  $C-R^k$ , seleccionándose  $R^k$  entre el grupo constituido por H, F, Cl, Br, I, grupos alifáticos, grupos alicíclicos, grupos aromáticos y partes de un ciclo aromático o heterocíclico condensado sustituido;
- 15 estando asociado el compuesto fotoluminiscente covalentemente o no covalentemente con un vehículo que es una perla.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el compuesto fotoluminiscente es simétrico.
- 20 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el compuesto fotoluminiscente es asimétrico.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que n es 1.
- 25 5. Un procedimiento para realizar un ensayo fotoluminiscente, procedimiento que comprende:
- excitar un compuesto fotoluminiscente según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con luz de excitación, y detectar la luz de emisión emitida por el compuesto fotoluminiscente..