

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 395**

51 Int. Cl.:
C09B 23/02 (2006.01)
C07D 209/24 (2006.01)
C07D 209/10 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04791610 .1**
96 Fecha de presentación: **29.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1678258**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **REACTIVOS DE MARCADO CON COLORANTES DE CIANINA.**

30 Prioridad:
31.10.2003 US 516428 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.01.2012

73 Titular/es:
GE HEALTHCARE LIMITED
AMERSHAM PLACE
LITTLE CHALFONT BUCKINGHAMSHIRE HP7
9NA, GB y
CARNEGIE MELLON UNIVERSITY

72 Inventor/es:
WEST, R.M.;
BOSWORTH, N. y
MUJUMDAR, Ratnakar, B.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 372 395 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

Reactivos de marcado con colorantes de cianina

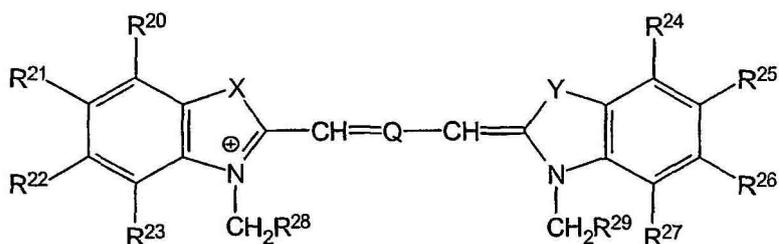
La presente invención se refiere al campo de los reactivos de marcado, en particular colorantes reactivos con cianina que tienen uno o varios grupos solubilizantes unidos a los anteriores y a los procedimientos que utilizan dichos colorantes.

5 Las marcas fluorescentes se han instituido como los medios de detección de elección en el análisis con micromatrices. Existen numerosos procedimientos diferentes para producir sondas de ácidos nucleicos marcadas con colorantes fluorescentes. Entre estos se incluyen la incorporación directa de nucleótidos marcados con colorantes en el ADNc mediante un sistema enzimático de transcriptasa inversa. Una alternativa es una solución de marcado indirecto y utiliza un análogo de nucleótido químicamente reactivo (por ejemplo, aminoalil-dUTP) o un análogo de nucleótido biotinilado que se incorpora a una primera cadena de ADNc durante la síntesis, seguido por el marcado posterior con marcas de colorantes reactivos o de afinidad, que se unen tanto covalentemente como no covalentemente con el nucleótido modificado. Las estrategias de marcado posterior en el análisis con micromatrices tienen el potencial de ofrecer una sensibilidad mejorada de detección, especialmente para dianas poco expresadas y permiten el uso de menos ARNm. Sigue existiendo, sin embargo una necesidad de procedimientos de detección ultrasensibles tales como los que se pueden obtener mediante el uso de múltiples marcas, tanto mediante marcado químico de la molécula de ácido nucleico, como mediante el uso de conjugados de avidina o estreptavidina.

10 Los colorantes con cianina ofrecen numerosas ventajas sobre otros colorantes fluorescentes. Los espectros de excitación y emisión de los colorantes con cianina amplían el espectro visible y en el infrarrojo cercano desde 450 nm a 800 nm. Además, los colorantes con cianina están caracterizados por tener coeficientes de extinción muy elevados, rendimientos cuánticos favorables y buena fotoestabilidad. Véanse por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 6048982, 5268486, 5569587, (Waggoner, A.S. y col). Aunque el marcado posterior puede dar como resultado un elevado nivel de incorporación del colorante con cianina en el ADNc, o en la estreptavidina, existe sin embargo una tendencia hacia la autoasociación de algunos colorantes en solución o en la interfase sólido-líquido, lo que conduce a una reducción de los rendimientos cuánticos de la fluorescencia (Mishra, A. y col, Chem. Rev., (2000), 100(6), 1973-2012; Gruber, H. y col, Bioconjugate Chemistry, (2000), 11, 696-704).

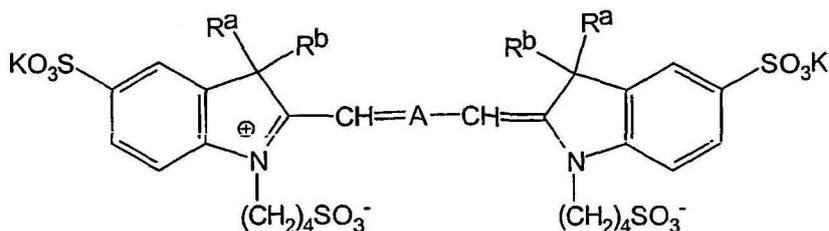
15 El documento WO 02/26891 (Molecular Probes Inc.) describe colorantes con carbocianina modificados y sus conjugados con materiales diana, en los que existe al menos un sistema de anillo de indolinio sustituido, en el que el sustituyente en la posición 3 del anillo del indolinio contiene un grupo químicamente reactivo o una sustancia conjugada. Los colorantes modificados de acuerdo con el documento WO 02/26891, se informa que superan la tendencia de los colorantes con cianina de autoasociarse (es decir, apilarse) y los conjugados de colorantes marcados con los colorantes modificados se informa que son más fluorescentes que los conjugados marcados con colorantes con carbocianina estructuralmente similares.

20 La Patente de los Estados Unidos 6083485 (Lichia y col.) se refiere a un procedimiento diagnóstico *in vivo* basado en la radiación del infrarrojo cercano (IRC) que usa colorantes que tienen la siguiente estructura:



25 en la que los grupos X e Y incluyen los grupos $-C(CH_2R^{32})(CH_2R^{33})$ y los grupos R^{20} a R^{29} , R^{32} y R^{33} se pueden sustituir por grupos que incluyen restos hidroxilo, carboxilo, ácido sulfónico, carboxialquilo, alcocarbonilo o alcóxioalquilo que contienen hasta 10 átomos de carbono, o un resto sulfoalquilo que contiene hasta 4 átomos de carbono.

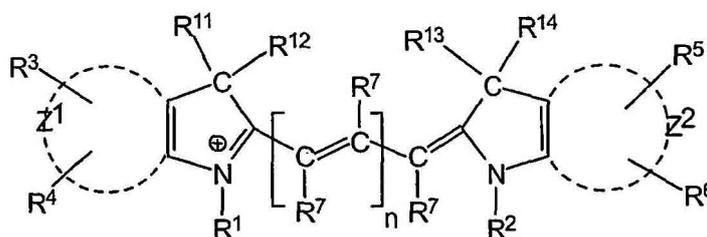
30 La Solicitud de Patente Japonesa N 5313304 (Fuji Photo Film Co. Ltd.) da a conocer un material fotográfico sensible con haluro de plata que incorpora un colorante que contiene múltiples grupos sulfonato y que está representado por la fórmula:



en la que R^a y R^b pueden ser restos alquil carboxilato o alquil sulfonato.

5 Ninguno de los documentos de la técnica anterior da a conocer específicamente un colorante con cianina que tenga uno o más grupos ácido sulfónico o ácido fosfónico solubilizantes en agua unidos en la posición 3 del sistema de anillo de indolinio, en el que el colorante proporciona también al menos un grupo adecuado para dirigir el marcado covalente o no covalente de un materia diana. Se ha encontrado ahora que un nuevo tipo de reactivos de marcado con colorantes con cianina son útiles para marcar y detectar materiales biológicos y otros. Se ha encontrado que la presencia de uno, y preferiblemente de múltiples, grupos solubilizantes en agua unidos en la posición 3 del anillo de indolinio reduce las interacciones colorante-colorante, particularmente cuando múltiples moléculas de colorante están unidas a componentes
10 tales como ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, etc. Como resultado, se minimiza la caída en la intensidad de la fluorescencia, que se asocia normalmente con múltiples componentes marcados y se debe al apilamiento colorante-colorante.

De acuerdo con esto, en un primer aspecto, se proporciona un compuesto de fórmula (I):



(I)

15 en la que:

los grupos R^3 y R^4 están unidos a la estructura de anillo Z^1 y los grupos R^5 y R^6 están unidos a la estructura de anillo Z^2 y $n = 1, 2$ o 3 .

Z^1 y Z^2 representan independientemente los átomos de carbono necesarios para completar un anillo, o un sistema de dos anillos aromáticos bifusionados;

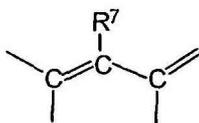
20 al menos uno de los grupos $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ y R^7 es el grupo $-E-F$ en el que E es un grupo separador que tiene una cadena de 1-20 átomos unidos seleccionados entre el grupo constituido por átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno y F es un grupo reactivo seleccionado entre éster de succinimidilo, éster de sulfo-succinimidilo, isotiocianato, maleimida, haloacetamida y fosforamidita;

25 uno o más de los grupos R^{11}, R^{12}, R^{13} y R^{14} que se seleccionan independientemente del grupo $-(CH_2)_k-W$, en el que W es ácido sulfónico o ácido fosfónico y k es un entero de 1 a 10;

cualquiera de los grupos R^3, R^4, R^5 y R^6 no es dicho grupo $-E-F$, dichos grupos restantes R^3, R^4, R^5 y R^6 se seleccionan independientemente entre hidrógeno y ácido sulfónico;

cualquiera de los grupos R^{11}, R^{12}, R^{13} y R^{14} no es dicho grupo $-(CH_2)_k-W$, dichos grupos restantes R^{11}, R^{12}, R^{13} y R^{14} son independientemente alquilo $C_1 - C_6$;

los grupos R⁷ restantes son hidrógeno o dos de R⁷ junto con el grupo,



forman un sistema de anillo de hidrocarburo que tiene 5 o 6 átomos.

De manera adecuada, el compuesto de acuerdo con el primer aspecto incluye uno o más contraiones, que pueden ser positivos o negativos para equilibrar la carga (o cargas) formal del cromóforo del colorante. La naturaleza del contraión no es material de la invención y podría ser uno de muchos iones conocidos tales como NH₄⁺, K⁺, Na⁺, trifluoroacetato (F₃C-CO₂⁻), perclorato (ClO₄⁻), Br⁻, o I⁻. En el contexto de la presente invención, deberá entenderse que los términos “ácido sulfónico” y “ácido fosfónico” incluirán también respectivamente los grupos “sulfonato” y “fosfonato”, debido a que son las formas ionizadas de los ácidos parentales.

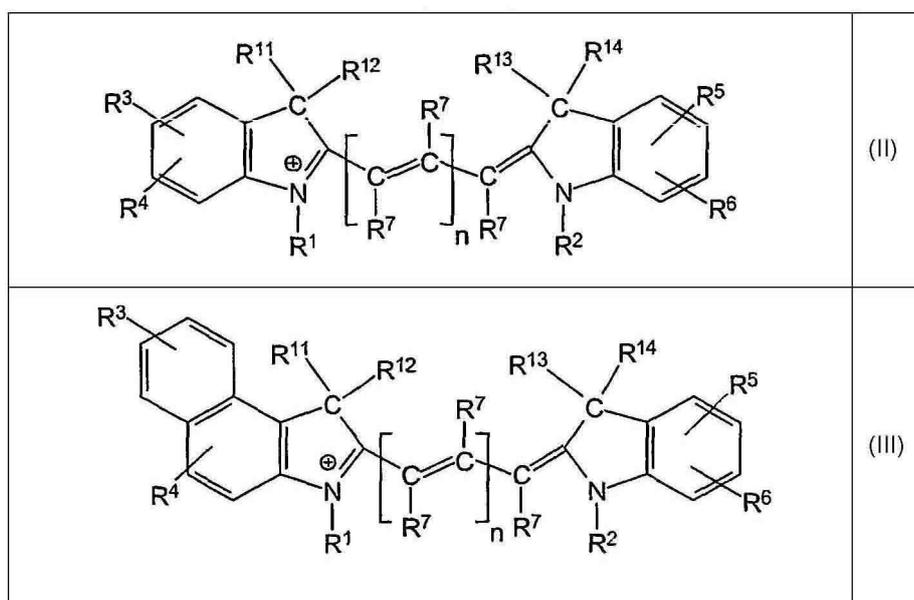
De manera adecuada, al menos dos de los grupos R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ son el grupo -(CH₂)_k-W. En una forma de realización preferida, uno de los grupos R¹¹ y R¹², y uno de los grupos R¹³ y R¹⁴, es el grupo -(CH₂)_k-W, en el que W y k, son como se ha definido anteriormente en el presente documento. En estas formas de realización, los grupos restantes R¹¹ o R¹² y R¹³ o R¹⁴ son preferiblemente metilo. En las formas de realización preferidas, los compuestos de la presente invención son aquellos en los que W es ácido sulfónico. Preferiblemente k es 3 o 4. El -(CH₂)_k-W particularmente preferido se ha seleccionado entre -(CH₂)₃-SO₃H y -(CH₂)₄-SO₃H.

De manera adecuada, cuando cualquiera de los grupos R¹ y R² no es dicho grupo -E-F, se pueden seleccionar dichos grupos restantes R¹ y R² entre alquilo C₁ - C₆, bencilo tanto no sustituido como sustituido con ácido sulfónico, y el grupo -(CH₂)_k-W, en el que W y k son como se ha definido anteriormente en el presente documento. Preferiblemente, dichos grupos restantes R¹ y R² se pueden seleccionar entre alquilo C₁ - C₆, sulfobencilo y el grupo -(CH₂)_k-W. Los grupos alquilo preferidos son metilo y etilo.

En los colorantes de acuerdo con el primer aspecto, cuando se sustituye R⁷ por el grupo -E-F, se sustituye preferiblemente en la posición meso, por lo cual se entiende que el grupo R⁷ central en la cadena de polimetina que se une a las estructuras del anillo heterocíclico puede estar sustituido con un grupo de unión diana. Cualquier grupo R⁷ restante que se produce en la cadena de polimetina es hidrógeno.

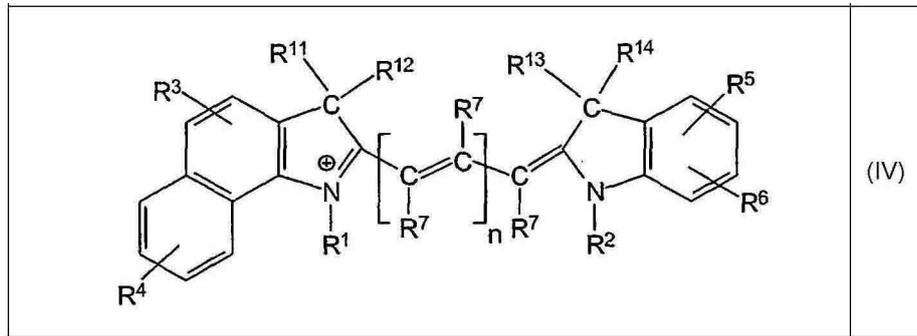
De manera adecuada, Z¹ y Z² se seleccionan independientemente entre fenilo y naftilo. Los ejemplos particulares de colorantes con cianina de acuerdo con el compuesto de fórmula (I) y que tienen uno o dos sistemas de anillo aromático fusionados se muestran como las estructuras (II), (III), (IV), (V) y (VI) en la Tabla 1.

Tabla 1

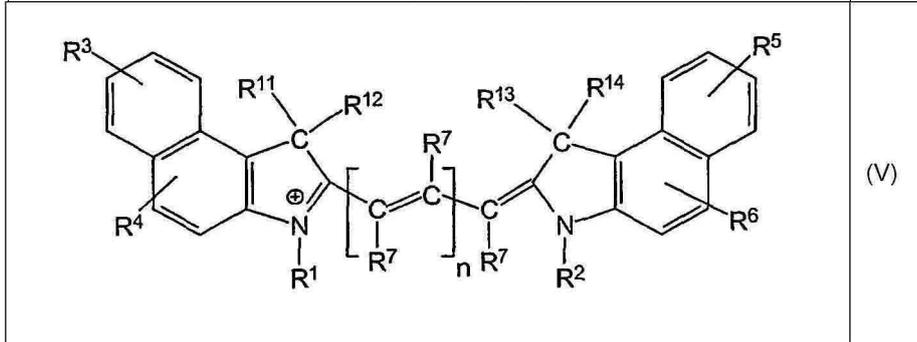


(continuación)

5

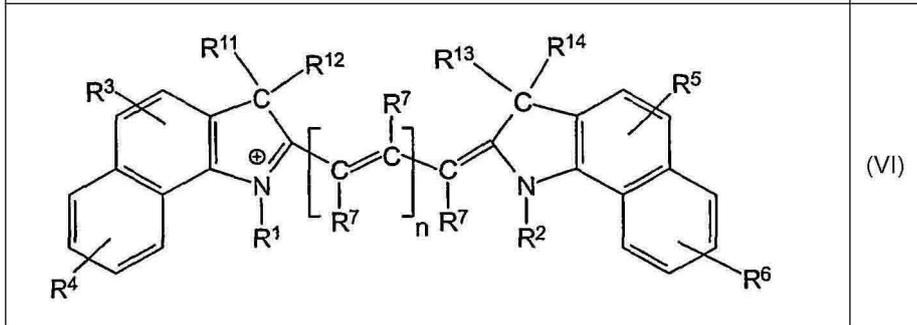


10



15

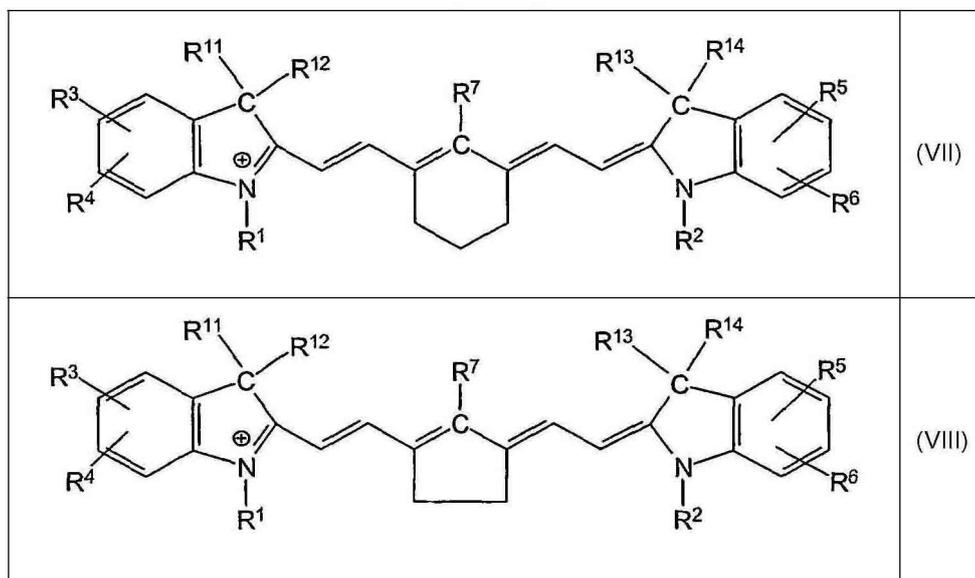
20



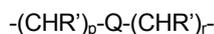
25

En la Tabla 2 se muestran los ejemplos de compuestos en los que los grupos R⁷ forman un sistema de anillo de hidrocarburo como las estructuras (VII) y (VIII), los grupos R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴ y n son como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Tabla 2

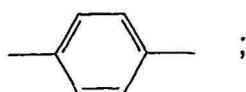


El resto E enlazante se une al grupo F de unión a la diana con el resto cromóforo de los compuestos de acuerdo con la fórmula (I). En una forma de realización, el grupo de unión diana F se puede unir directamente a las posiciones R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o R^7 del colorante, en cuyo caso E es un único enlace covalente. En otra forma de realización preferida, el grupo de unión diana F se puede unir covalentemente a las posiciones R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 o R^7 del colorante indirectamente, mediante un grupo separador. En esta forma de realización, E es de manera adecuada una cadena lineal o ramificada de entre 1 a 20 átomos unidos que contienen átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno. Preferiblemente, el grupo separador E se selecciona de:



en la que Q se ha seleccionado entre: $-CHR'$ -, $-NR'$ -, $-O-$, $-CR'=CR'$ -, $-Ar-$, $-C(O)-NR'$ - y $-C(O)-O-$; R' es hidrógeno o alquilo $C_1 - C_4$, p es 0 - 5 y r es 1 - 5.

Los enlazantes particularmente preferidos son aquellos en los que Q se ha seleccionado entre: $-CHR'$ -, $-C(O)-NH-$ y



en la que R' es tal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

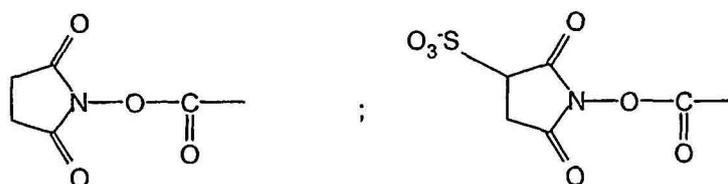
Los colorantes de acuerdo con la presente invención contienen al menos un grupo $-E-F$, normalmente no más de dos, y preferiblemente uno. El grupo F es un grupo que reacciona con un grupo complementario de un componente diana, con la formación de un enlace covalente entre el colorante y el componente. La selección dependerá de los grupos que están disponibles en el componente que se va a marcar y, como tal, como conocerá el experto en la técnica, puede reaccionar en condiciones adecuadas con un grupo funcional complementario de un componente. Los ejemplos de grupos funcionales presentes en los componentes, tales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y similares, incluyen hidroxilo, amino, sulfidriilo, carbonilo (incluyendo aldehído y cetona) y tiofosfato. El componente llega a marcarse con el colorante de acuerdo con la fórmula (I). Preferiblemente, el grupo reactivo es un éster de succinimidilo de un ácido carboxílico, un isotiocianato, una maleimida, una haloacetamida o una fosforamidita. En virtud de estos grupos reactivos y funcionales, los compuestos de fórmula (O) pueden reaccionar con y llegar a unirse covalentemente con el componente diana.

En la Tabla 3 se proporcionan los ejemplos de grupos reactivos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 en el compuesto de acuerdo con la fórmula (I) y los grupos con cuyos grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 pueden reaccionar.

Tabla 3: Posibles sustituyentes reactivos y grupos funcionales reactivos con los anteriores

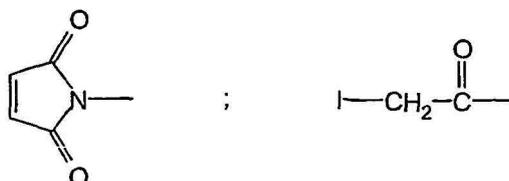
| Grupos reactivos | Grupos funcionales |
|--|--|
| éster de succinimidilo, éster de sulfo-succinimidilo | amino primario, amino secundario |
| Isotiocianato | grupos amino |
| haloacetamidas, maleimididas | tioles, imidazoles, hidroxilo, aminas, tiofosfatos |
| fosforamiditas | grupos hidroxilo |

Los grupos reactivos R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ particularmente preferidos que son especialmente útiles para el marcado de los componentes diana con grupos funcionales amino e hidroxilo disponibles incluyen:



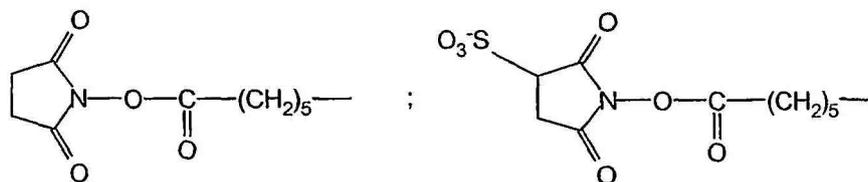
5

Los grupos reactivos R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ particularmente preferidos que son útiles para el marcado de los componentes diana con grupos funcionales tiol disponibles incluyen:



10

Los ejemplos particularmente preferidos del grupo -E-F son aquellos que comprenden un grupo E carboxipentilo, por ejemplo:



15

En las formas de realización adicionales, los colorantes con cianina fluorescentes de la presente invención pueden contener uno o más grupos de ácido sulfónico adicionales. En una forma de realización adecuada, se pueden unir uno o más grupos de ácido sulfónico directamente a las estructuras del anillo Z¹ y/o Z². En una forma de realización alternativa, las posiciones R¹ y/o R² se pueden sustituir directamente con sulfobencilo o el grupo -(CH₂)_k-W, donde W y k son como se ha definido anteriormente en el presente documento. En esta forma de realización, se puede sustituir opcionalmente el colorante con uno o más grupos de ácido sulfónico unidos directamente a las posiciones R³, R⁴, R⁵ and R⁶. De esta manera, se pueden sustituir los colorantes de acuerdo con la presente invención con hasta cinco o más grupos de ácido sulfónico, preferiblemente, entre tres y cinco grupos de ácido sulfónico. El uso de colorantes de cianina sustituidos con tres o más grupos de ácido sulfónico para el marcado de moléculas biológicas diana da como resultado un producto marcado en el que se reduce la agregación colorante-colorante, interacciones en estado excitado despreciables y por tanto, un apagado rápido mínimo colorante-colorante y una pérdida de fluorescencia. La intensidad de emisión de la

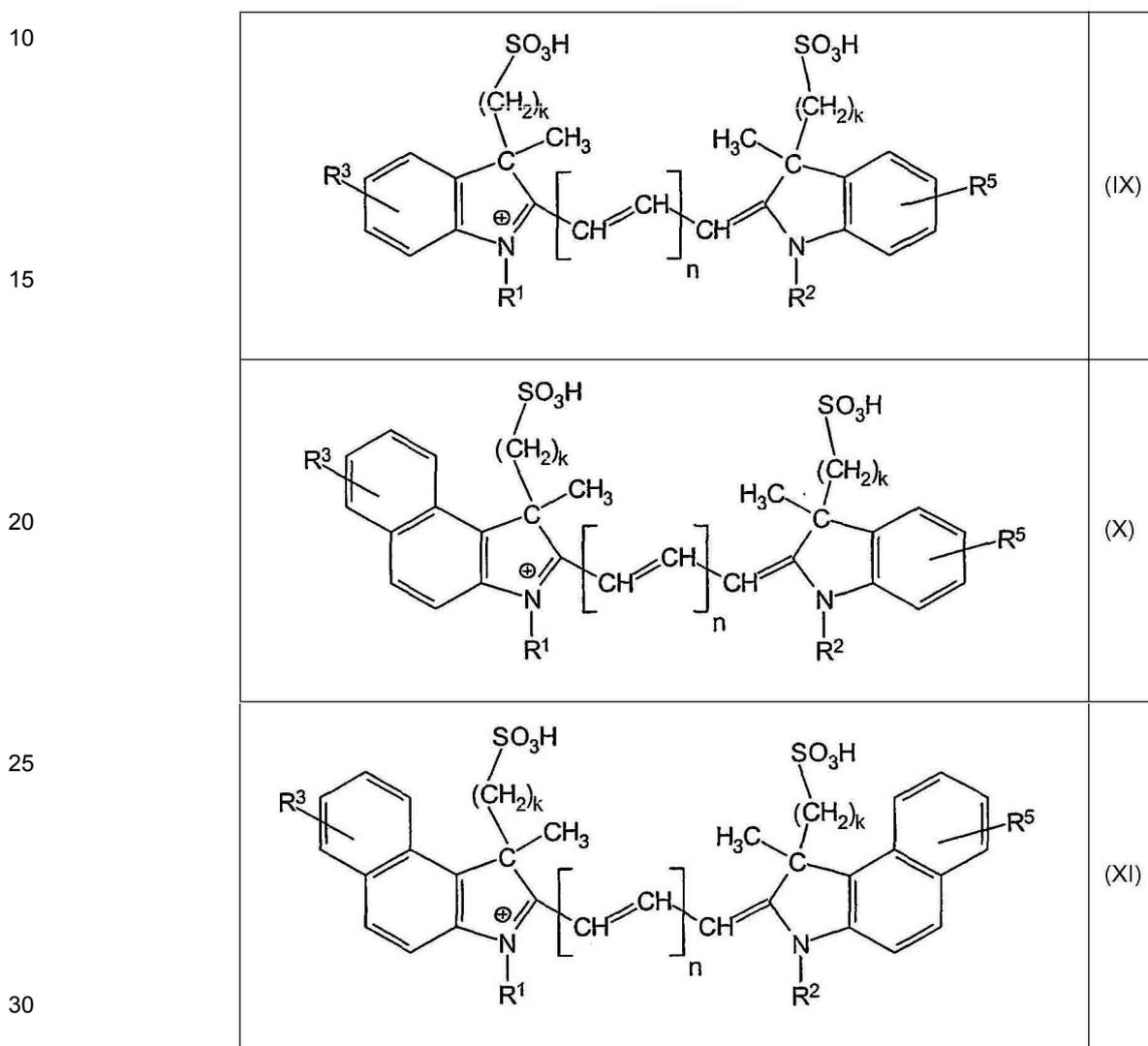
20

fluorescencia de una molécula así marcada con los colorantes preferidos de la presente invención aumenta con el número de colorantes unidos covalentemente. Además, la sustitución de la posición 3 del indolinio con los grupos de ácido sulfónico además de aumentar la carga global en la molécula de colorante, añade también volumen estérico, contribuyendo por tanto a una reducción en la agregación colorante-colorante.

5 Se seleccionan los grupos halógeno y halo entre fluor, cloro, bromo y yodo.

Lo que sigue son ejemplos más específicos de colorantes de cianina de acuerdo con la invención, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4



En las estructuras (IX), (X) y (XI), $n = 1, 2$ o 3 ;

al menos uno de los grupos R^1, R^2, R^3 and R^5 es el grupo $-E-F$ en el que E y F se han definido anteriormente en el presente documento;

35 cuando cualquiera de los grupos R^1 y R^2 no es dicho grupo $-E-F$, dichos grupos restantes R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre metilo, etilo y $-(CH_2)_k-W$, en el que W es ácido sulfónico y k es 3 o 4;

cualquiera de los grupos R^3 y R^5 no es dicho grupo $-E-F$, dichos grupos restantes R^3 y R^5 se seleccionan independientemente entre hidrógeno y ácido sulfónico, preferiblemente ácido sulfónico.

40 En las estructuras (IX), (X) y (XI), el grupo $-E-F$ es de manera adecuada un derivado de éster de succinimidilo de un ácido alquil carboxílico, preferiblemente 5-carboxipentilo, éster de N-hidroxisuccinimidilo, o 5-carboxipentilo, éster de N-

hidroxi-sulfosuccinimidilo.

Los ejemplos particulares de colorantes de acuerdo con la invención son como sigue:

i) 2-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil)-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3*H*-indolio-5-sulfonato;

5 ii) 2-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil)-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3*H*-indolio-5-sulfonato;

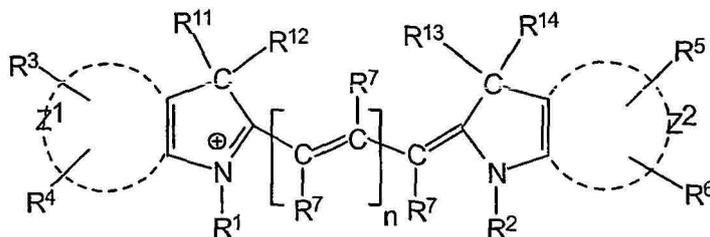
iii) 2-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*)-7-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ilideno]hepta-1,3,5-trienil)-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3*H*-indolio-5-sulfonato;

10 iv) 2-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*)-7-[5-(carboximetil)-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ilideno]hepta-1,3,5-trienil)-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3*H*-indolio-5-sulfonato; y

v) 1-bencil-2-((1*E*,3*E*,5*E*)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil)-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3*H*-indolio-5-sulfonato.

15 La presente invención se refiere también a procedimientos de marcado en los que los compuestos de la presente invención que incluyen al menos el grupo F unido a las posiciones R¹ a R⁷ como se ha definido anteriormente en el presente documento se pueden usar para marcar, y por tanto, impartir propiedades fluorescentes a un componente diana. En particular, se pueden usar para marcado y detección múltiples de moléculas biológicas, tal como ácidos nucleicos, ADN; ARN, oligonucleótidos, nucleótidos, proteínas, péptidos, anticuerpos, etc. De esta manera, en un segundo aspecto, se proporciona un procedimiento para marcar un componente, comprendiendo el procedimiento:

i) poner en contacto dicho componente con un compuesto de fórmula (I):



(I)

20

en la que:

los grupos R³ y R⁴ se unen a la estructura del anillo Z¹ y los grupos R⁵ y R⁶ se unen a la estructura del anillo Z², y n = 1, 2 o 3;

25 Z¹ y Z² representan independientemente los átomos de carbono necesarios para completar un anillo, o un sistema de dos anillos aromáticos bifusionados;

al menos uno de los grupos R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ es el grupo -E-F en el que E es un grupo separador que tiene una cadena de 1-20 átomos unidos seleccionados entre el grupo constituido por átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno y F es como se ha definido anteriormente;

30 uno o más de los grupos R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ se seleccionan independientemente del grupo -(CH₂)_k-W, en el que W es ácido sulfónico o ácido fosfónico y k es un entero entre 1 y 10;

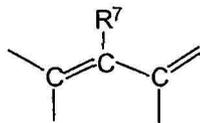
cuando cualquiera de los grupos R¹ y R² no es dicho grupo -E-F, dichos grupos R¹ y R² restantes se seleccionan independientemente entre alquilo C₁ - C₆, bencilo, tanto no sustituido como sustituido con ácido sulfónico, y el grupo -(CH₂)_k-W, en el que W y k son como se ha definido anteriormente en el presente documento;

cuando cualquiera de los grupos R³, R⁴, R⁵ y R⁶ no es dicho grupo -E-F, dichos grupos R³, R⁴, R⁵ y R⁶ restantes se

seleccionan independientemente entre hidrógeno y ácido sulfónico;

cuando cualquiera de los grupos R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} no es dicho grupo $-(CH_2)_k-W$, dichos grupos R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} restantes son independientemente alquilo $C_1 - C_6$;

los grupos R^7 restantes son hidrógeno o dos de R^7 junto con el grupo,



5

forman un sistema de anillo hidrocarburo que tiene 5 o 6 átomos; e

(ii) incubar dicho colorante fluorescente con dicho componente en condiciones adecuadas para la unión y por tanto, marcar dicho componente.

10

F es un grupo adecuado para la formación de un enlace covalente entre el compuesto de fórmula (I) y el componente diana, como se ha definido anteriormente en el presente documento. El procedimiento comprende incubar el componente que se va a marcar con una cantidad del compuesto de acuerdo con la invención en condiciones tales que el colorante llega a unirse al componente. Las personas expertas en la técnica conocerán los procedimientos para la formación de conjugados o complejos de colorantes con componentes diana. Por ejemplo, el marcado covalente de las proteínas se lleva a cabo normalmente en un medio acuoso tamponado, de manera adecuada, bicarbonato a pH 9,0, a temperatura ambiente durante un periodo de normalmente 1 hora. La reacción se lleva a cabo normalmente en la oscuridad. Se puede separar la proteína marcada de cualquier colorante sin reaccionar mediante cromatografía de exclusión por tamaño, por ejemplo, usando Sephadex™ como fase estacionaria y tampón fosfato, pH 7,0 como eluyente. Para el marcado múltiple de una biomolécula diana, la relación de la cantidad o la concentración de colorante a material diana deberían ajustarse de acuerdo con esto. Los componentes biológicos diana adecuados incluyen, pero no se limitan al grupo constituido por anticuerpos, lípidos, proteínas, péptidos, carbohidratos, nucleótidos que contienen o se derivatizan para contener uno o más de un grupo amino, sulfidril, carbonilo, hidroxilo y carboxilo y tiofosfato, y los ácidos oxi o desoxipolínucleicos que contienen, o se derivatizan para contener uno o más de un grupo amino, sulfidril, carbonilo, hidroxilo, carboxilo y tiofosfato, materiales microbianos, fármacos, hormonas, células membranas celulares y toxinas.

15

20

25

Además de los anteriores procedimientos de marcado en una etapa, la presente invención se refiere también a los procedimientos de marcado en dos etapas en los que, en una primera etapa, un colorante de acuerdo con la presente invención se une a, y por tanto, marca un componente primario, tal como un anticuerpo, proteína, sonda de ADN, etc. En la segunda etapa del procedimiento de marcado, el componente primario marcado fluorescentemente se usa a continuación como una sonda para la detección de un componente secundario, tal como un antígeno para el cual el anticuerpo es específico.

30

35

Los compuestos de la presente invención se pueden usar también para determinar la concentración de una proteína particular u otro componente en un sistema. Si se conoce el número de grupos reactivos en una proteína que pueden reaccionar con una sonda, se puede conocer la fluorescencia por molécula y se puede determinar la concentración de estas moléculas en el sistema, mediante la intensidad total de la fluorescencia del sistema. Se puede usar este procedimiento particular para medir la concentración de diversos analitos marcados usando lectores de placas de microvaloración u otros sistemas conocidos de detección de la inmunofluorescencia. Se puede determinar también la concentración del material marcado fluorescentemente usando, por ejemplo, instrumentos de detección de la polarización de la fluorescencia.

40

45

Los compuestos de la presente invención también se pueden usar en un procedimiento de detección en el que se unen covalentemente una pluralidad de colorantes fluorescentes a una pluralidad de componentes primarios diferentes, tales como anticuerpos, siendo específico cada componente primario de un componente secundario diferente, tal como un antígeno, con el fin de identificar cada uno de una pluralidad de componentes secundarios en una mezcla de componentes secundarios. De acuerdo con este procedimiento de uso, cada uno de los componentes primarios se marca por separado con un colorante fluorescente que tiene una longitud de onda de absorción y emisión de la luz diferentes características, en comparación con las moléculas de colorantes usadas para marcar los otros componentes primarios. Los componentes primarios marcados se añaden a continuación a la preparación que contiene los componentes secundarios, tales como los antígenos, y se dejan unir los componentes primarios a los respectivos componentes secundarios para los cuales son selectivos.

50

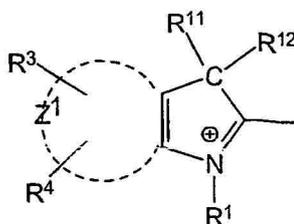
Se puede retirar de la preparación cualquier material de la sonda que no haya reaccionado mediante, por ejemplo, lavado, para evitar la interferencia con el análisis. A continuación se somete la preparación a una gama de longitudes de onda de excitación que incluyen las longitudes de onda de absorción de compuestos fluorescentes particulares. Se emplea a continuación un microscopio de fluorescencia u otro sistema de detección de la fluorescencia, tal como un

5 citómetro de flujo o un espectrofotómetro de fluorescencia, que tiene filtros o monocromadores para seleccionar los rayos de las longitudes de onda de excitación y para seleccionar las longitudes de onda de la fluorescencia, para determinar la intensidad de las longitudes de onda de emisión que corresponden a los compuestos fluorescentes utilizados, indicando la intensidad de la fluorescencia la cantidad del componente secundario que se ha unido con un componente primario
 10 marcado particular. Las técnicas conocidas para llevar a cabo estudios de fluorescencia multiparámetros incluyen, por ejemplo, citometría de flujo multiparámetros. En algunos casos, se puede usar una única longitud de onda de excitación para excitar la fluorescencia de dos o más materiales en una mezcla en la que cada uno fluoresce a una longitud de onda diferente y se puede medir la cantidad de cada una de las especies marcadas detectando su intensidad de la fluorescencia individual y su respectiva longitud d onda de emisión. Si se desea, se puede emplear también un procedimiento de absorción de la luz.

15 Se puede aplicar el procedimiento de detección de la presente invención a cualquier sistema en el que es posible la creación de un componente primario fluorescente. Por ejemplo, se puede conjugar un compuesto fluorescente reactivo apropiadamente con un fragmento de ADN o ARN y se puede producir el conjugado resultante para unirse a una cadena de ADN o ARN diana complementaria. A continuación, se puede emplear el equipo apropiado de detección de la fluorescencia para detectar la presencia de conjugados fluorescentes unidos.

La presente invención se refiere a intermedios y a procedimientos útiles para preparar los colorantes de fórmula (I) que se preparan adecuadamente mediante un procedimiento que comprende:

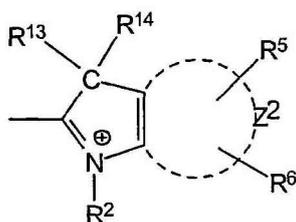
a) hacer reaccionar un primer compuesto intermedio que tiene la fórmula (A):



(A)

20 en la que Z^1 , R^1 , R^3 , R^4 , R^{11} y R^{12} son como se han definido anteriormente en el presente documento;

b) un segundo compuesto intermedio que puede ser igual o diferente del primer compuesto intermedio y que tiene la fórmula (B):



(B)

en la que Z^2 , R^2 , R^5 , R^6 , R^{13} y R^{14} son como se han definido anteriormente en el presente documento, y

25 c) un tercer compuesto (C) adecuado para formar un enlace entre el primer y el segundo compuestos;

con la condición de que al menos uno de los grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 sea el grupo -E-F, en el que E y F sean como se han definido anteriormente en el presente documento; y con la condición que uno o más de los grupos R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} se seleccionen independientemente del grupo $-(CH_2)_k-W$, en el que W se ha seleccionado entre grupos de ácido sulfónico y ácido fosfónico y k es un entero de 1 a 10.

Preferiblemente, $-(CH_2)_k-W$ se ha seleccionado entre $-(CH_2)_3-SO_3H$ y $-(CH_2)_4-SO_3H$.

De acuerdo con el procedimiento, se pueden hacer reaccionar los compuestos intermedios (A), (C) y (B) tanto en un procedimiento de etapa única como en un procedimiento de etapa múltiple para formar los compuestos de fórmula (I). Se pueden preparar adecuadamente los compuestos simétricos de fórmula (I) en el que las estructuras (A) y (B) son iguales haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (A) (o (B)) en dos proporciones molares con un fragmento de metina bisfuncional apropiado que contiene 1,3 o 5 átomos de carbono, sustituidos con un grupo para formar R7 como se ha definido anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, se empleará una N,N'-difenilformamidina sustituida o un ortoéster como el tercer compuesto (C) para preparar análogos de colorante con trimetina cianina. De una manera correspondiente, se puede emplear un malondialdehído diamilo sustituido adecuado para preparar análogos del colorante con pentametina cianina y un aldehído glutacónico para preparar análogos de colorante con heptametina cianina. La reacción se lleva a cabo normalmente en un disolvente orgánico tal como piridina y se calienta a reflujo. Posteriormente, se enfría la mezcla y se vierte en un disolvente orgánico tal como éter. Se puede purificar el sólido o semisólido resultantes mediante cromatografía sobre una columna de gel de sílice usando una serie de disolventes de metanol/cloroformo.

Se pueden preparar convenientemente compuestos no simétricos de fórmula (I) en los que las estructuras (A) y (B) son diferentes, en un procedimiento en dos etapas. En este procedimiento, se forma en primer lugar un compuesto intermedio haciendo reaccionar un compuesto de indolinio de fórmula (A) con un compuesto adecuado para formar el enlace, por ejemplo, una N,N' difenilformamidina sustituida, o malonaldehído diamilo, en presencia de anhídrido acético, para formar una sal cuaternaria de 2-anilinovinilo o 4-anilino-1,3-butadienilo. Se puede hacer reaccionar la sal cuaternaria intermedia con una segunda sal cuaternaria de 2-metil indolinio para dar un compuesto de fórmula (I). Se conocen intermedios alternativos para formar el enlace de polimetina que se une a los sistemas de anillos heterocíclicos y se describen por ejemplo en Hamer, F.M., "The Cyanine Dyes and Related Compounds", Interscience (1964).

Se apreciará fácilmente que algunos colorantes de la presente invención pueden ser útiles como intermedios para la conversión a otros colorantes mediante procedimientos bien conocidos de los expertos en la técnica. Se pueden sintetizar los colorantes de la presente invención mediante los procedimientos dados a conocer en el presente documento. Los derivados de los compuestos que tienen una particular utilidad se preparan tanto seleccionando los precursores apropiados como modificando los compuestos resultantes mediante procedimientos conocidos para incluir grupos funcionales en una variedad de posiciones. Se pueden seleccionar los grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 de tal manera que los colorantes de la presente invención tengan diferentes características de longitudes de onda, proporcionando por tanto numerosos colorantes relacionados que se pueden usar en análisis multiparámetros en los que se puede diferenciar la presencia y cantidad de diferentes compuestos en una única muestra basándose en las longitudes de onda de numerosas emisiones fluorescentes detectadas.

Cy™ es una marca comercial de Amersham Biosciences UK Limited.

La invención se ilustra además por referencia a los siguientes ejemplos y figuras, en los que:

La Figura 1 (A y B) son representaciones gráficas que muestran la relación de colorante/proteína frente a la cantidad de éster NHS aplicado para el Compuesto 2 y el Compuesto 5.

La Figura 2 es la representación gráfica de la intensidad de la fluorescencia relativa frente a la relación de colorante/proteína a una concentración constante de anticuerpo para los colorantes con pentametina cianina.

La Figura 3 muestra los espectros de absorción de los Conjugados de IgG del Compuesto 5 y el Compuesto 2 a relaciones bajas y altas de colorante/proteína.

La Figura 4 muestra los espectros de absorción de los Conjugados de IgG del Compuesto 6 en comparación con los Compuestos 3 y 4 a relaciones altas de colorante/proteína.

La Figura 5 es una representación gráfica que muestra la intensidad de la fluorescencia relativa frente a la relación colorante/proteína para colorantes con heptametina cianina.

La figura 6 es un barrido espectral (200-700 nm) del ADNc marcado con el Compuesto 2.

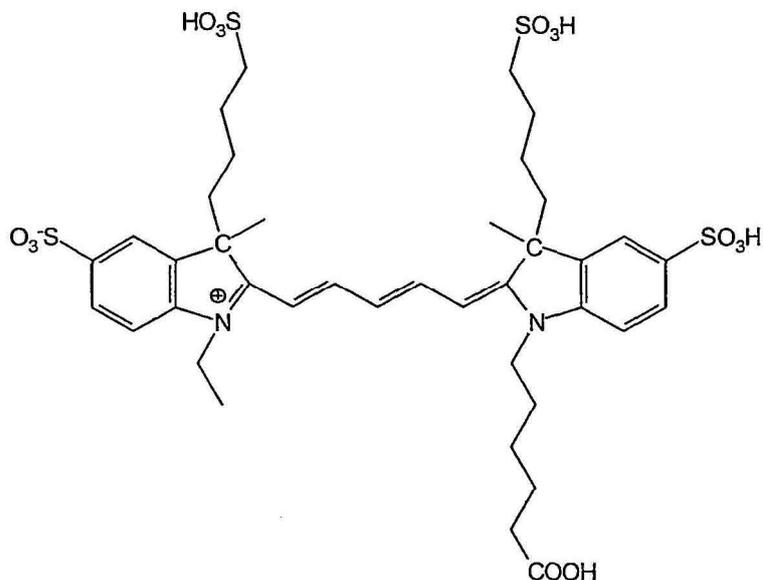
La Figura 7 es un barrido espectral (200-700 nm) del ADNc marcado con el Compuesto 5.

La Figura 8 es un barrido espectral (200-700 nm) del ADNc marcado con el Compuesto 6.

La Figura 9 es una representación gráfica que muestra la absorbancia UV medida a intervalos durante 120 horas para los compuestos 2, 5 y 6.

Ejemplos

1. 2-((1E,3E,5E)-5-[1-(5-Carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil)-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (Compuesto 1)



1.1 5-(Etoxicarbonil)-5-metil-6-oxoheptano-1-sulfonato de sodio

Se suspendió hidruro de sodio (60% en peso, 12 g \equiv 0,3 mol de NaH) en DMF seco (100 ml). La suspensión resultante se enfrió con agitación a 0°C. Se añadió a esta una disolución de 2-metilacetato de etilo (50 g, 0,346 mol) en DMF (25 ml), gota a gota con el fin de mantener la temperatura a < 10°C y controlar la efervescencia. Una vez que se completó la adición y cesó la evolución del hidrógeno, se calentó la mezcla en un baño de agua caliente hasta que resultó una disolución transparente de color amarillo pálido. Se enfrió esta de nuevo a 0°C. Se añadió una disolución de 1,4-butanosultona (45 g, 0,33 mol) en DMF (25 ml durante 15 min, manteniendo la temperatura a < 10°C. Una vez se completó la adición, se calentó la mezcla a 50°C durante 16 h: A continuación se evaporó el disolvente a vacío hasta sequedad; se repartió el residuo entre agua y dietil éter. Se retuvo la capa acuosa; se extrajo la capa orgánica con agua fresca, a continuación se descartó. Los extractos acuosos combinados se lavaron con éter fresco, a continuación se evaporaron a vacío para dar el producto como un sólido céreo.

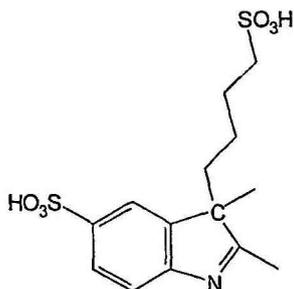
$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ 4,23 (2H, q), 2,9 (2H, app t), 2,26 (3H, s), 2,0-1,6 (6H, m), 1,36 (3H, s) y 1,26 (3H, t).

1.2 Ácido 5-metil-6-oxoheptano-1-sulfónico

El material anterior se calentó a 90°C en ácido clorhídrico concentrado (200 ml), hasta que la TLC indicó que la reacción se había completado (~ 3 h). A continuación se evaporó el disolvente a vacío; se purificó el resto mediante cromatografía instantánea (mezclas de Sílice. Etanol/diclorometano) para dar 49,6 g de ácido 5-metil-6-oxoheptano-1-sulfónico.

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ 2,9 (2H, app t), 2,68 (1 H, m), 2,2 (3H, s), 1,8-1,3 (6H, m) y 1,18 (3H, d).

1.3 Ácido 2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indol-5-sulfónico



20

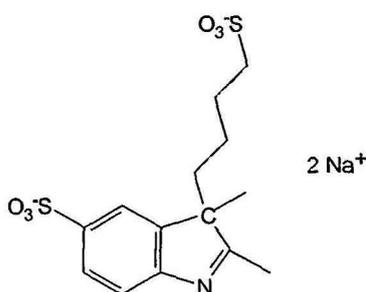
El ácido 4-hidrazinobencenosulfónico (7,5 g), ácido 5-metil-6-oxoheptano-1-sulfónico (11,0 g) y ácido acético (50 ml) se

calentaron a reflujo con nitrógeno durante 6 h, durante este tiempo se disolvió todo el sólido suspendido. A continuación se evaporó el disolvente a vacío y se trituró el residuo con 2-propanol a 80°C para dar un sólido marrón claro en suspensión. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el sólido se recogió mediante filtración, se lavó con 2-propanol y dietil éter y se secó a vacío. El producto se purificó mediante HPLC, recogiendo el pico principal detectado a 270 nm (Phenomenex Jupiter 15µ C18 300A, 250 x 50 mm, 100 ml/min. 0,5 g por ciclo. Eluyente isocrático agua + 0,1% de TFA). Las fracciones del producto se vertieron y evaporaron para dar 11,1 g.

UV/Vis (Agua+0.1% de TFA): 269, 229 nm

¹H-RMN (D₂O) δ 0,9 (2H, m), 1,6 (3H, s + 2H, m), 2,15 (2H, m), 2,75 (2H, m), 2,8 (CH₃ singlete principalmente intercambiado), 7,8 (1 H, d), 8,0 (1 H, dd) y 8,1 (1 H, d). LC-MS: encontrado 362. MH⁺ = C₁₄H₂₀NO₆S₂ requiere 362.

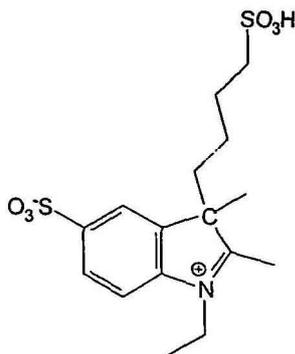
10 1.4 2,3-Dimetil-3-(4-sulfonatobutil)-3H-indol-5-sulfonato de disodio



Se disolvió ácido 2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indol-5-sulónico (3,6 g. 9,8 mmol) en agua (50 ml). La disolución resultante se neutralizó con acetato de sodio a un pH de ~ 7, a continuación, se evaporó el disolvente a vacío. El residuo pegajoso se evaporó simultáneamente con metanol, a continuación se trituró con éter para dar un sólido fino. Este se secó a vacío elevado con pentóxido de fósforo para dar la sal disódica del título que se usó directamente sin purificación.

¹H-RMN (D₂O) δ 0,6-0,8 (2H, m), 1,4 (3H, s), 1,6 (2H, m), 1,9-2,15 (2H, m amplio + s para acetato) 2,35 (CH₃ singlete principalmente intercambiado), 2,75 (2H, app t), 7,6 (1 H, d) y 7,83 (2H, m).

15 1.5 Sal de 1-etil-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indol-5-sulfonato

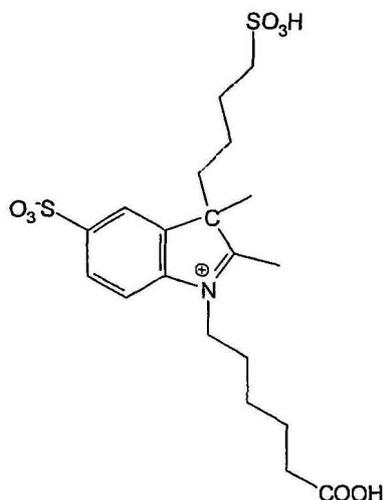


Se calentaron conjuntamente a 140°C durante 12 h 2,3-dimetil-3-(4-sulfonatobutil)-3H-indol-5-sulfonato de disodio (1 g), sulfonato de etil-p-tolueno (0,95 ml; 5,56 mmol) y tetrametilensulfona (10 ml). La TLC (sílice; 2:1 de MeOH; EtOAc) mostró la formación de una nueva mancha de producto (rf=0,8), que se volvió magenta tras reposar. El producto se precipitó en acetato de etilo y a continuación se eliminó mediante filtración y se secó a vacío para dar el producto bruto como un sólido de color púrpura oscuro; 1,5 g. El producto se purificó en múltiples manchas mediante HPLC (proteína y péptido Vydac C18 (250 mm x 25 mm); caudal 10 ml/min; gradiente de 0 a 25% de B durante 30 min; eluyente A = 0,1% de TFA en agua y eluyente B = 0,1% de TFA en acetonitrilo; detección a 220 nm). Las fracciones que contenían el producto deseado se vertieron y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo el producto como un aceite de color rosa pálido (400 mg).

LC-MS (ES+): encontrado 390. MH⁺ = C₁₆H₂₄NO₆S₂ requiere 390.

^1H RMN (D_2O) δ 0,86 (m, 2H), 1,56 (t, 3H), 1,75 (2xs, 5H), 2,36 (m, 2H), 2,75 (m, 2H), 4,60 (q, 2H), 7,96, 8,10 (dd, 2H), 8,15 (s, 1 H).

1.6 1-(5-Carboxipentil)-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato

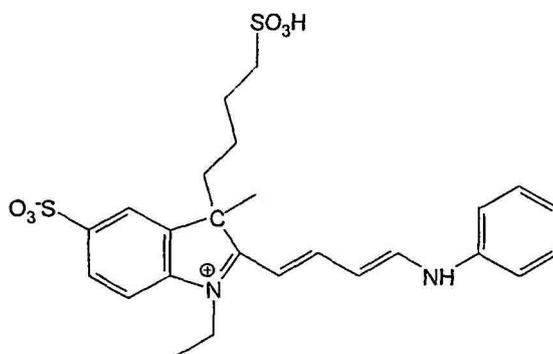


- 5 Se calentaron conjuntamente a 110°C con nitrógeno durante 14 h 2,3-dimetil-3-(4-sulfonatobutil)-3H-indol-5-sulfonato de disodio (1 g), ácido 6-bromohexanoico (3,2 g, 16,41 mmol) y tetrametilensulfona (5 ml). A continuación se añadió una alícuota adicional (3,2 g, 16,41 mmol) de ácido bromohexanoico y el calentamiento continuó durante 12 h. Se añadió a continuación una alícuota adicional (1,6 g, 8,21 mmol) de ácido 6-bromohexanoico y el calentamiento continuó durante 12 h más. Se enfrió la mezcla de reacción a TA y a continuación se vertió en acetato de etilo. Se eliminó el producto mediante filtración, se lavó con acetato de etilo y a continuación se secó *a vacío* a 40°C y se obtuvo como un sólido de color marrón (2,71 g). El producto se purificó según se requirió mediante HPLC (proteína y péptido Vydac C18 (250mm x 25mm); caudal 10 ml/min; gradiente de 0 a 25% de B durante 30 min; eluyente A = 0,1% de trietilamina en agua y eluyente B = 0,1% de trietilamina en metanol; detección a 220 nm). Las fracciones que contenían el producto deseado se vertieron y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo el producto como un aceite de color marrón amarillento, se obtuvo el producto purificado a partir del material bruto (100 mg) como la sal de trietil amonio (56 mg).

LC-MS (ES+): encontrado 476. $\text{MH}^+ = \text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NO}_8\text{S}_2$ requiere 476.

^1H RMN (D_2O) δ 0,85 (m, 2H), 1,3 (t, 27H), 1,50 (m, 2H), 1,62 (m, 9H), 2,00 (m, 2H), 2,25 (m, 4H), 2,39 (m, 1H), 2,75 (m, 2H), 3,20 (q, 18H), 4,55 (t, 2H), 7,95, 8,10 (dd, 2H), 8,14 (s, 1 H).

1.7 2-[(1E,3E)-4-Anilino-1,3-dienil]-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato



20

Se calentaron con nitrógeno a 130°C durante 8 h 1-etil-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato, bruto (1,1 g), clorhidrato de malonaldehído bis(fenilimina) (0,5 g) y ácido acético (20 ml) para dar una disolución de color naranja-rojo oscuro. A continuación se evaporó el disolvente a vacío; se repartió el residuo en una mezcla de agua / diclorometano /

metanol. El análisis UV/Vis (etanol) confirmó la presencia del producto en la capa acuosa superior ($\lambda_{\text{máx.}} = 524 \text{ nm}$) mientras que el material de partida del malonaldehído estuvo presente solo en la capa orgánica inferior ($\lambda_{\text{máx.}} = 384 \text{ nm}$). Se evaporó la capa acuosa a vacío y se purificó mediante HPLC (eluyentes, agua/0,1% de TFA y acetonitrilo/0,1% de TFA). Las fracciones que contenían el producto se vertieron y evaporaron, con secado final a vacío elevado con pentóxido de fósforo para dar el producto del título.

5

UV/Vis (Agua+0.1 % de TFA): 520 nm.

MS (MALDI-TOF): M+ 518.

1.8 2-[(1E,3E,5E)-5-[1-(5-Carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-iliden]penta-1,3-dienil]-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato

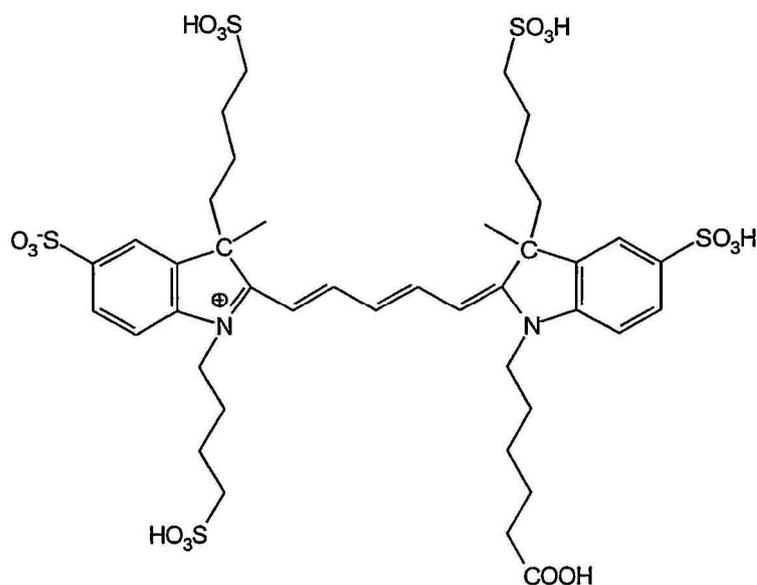
10 Se disolvió 2-[(1E,3E)-4-Anilino-1,3-dienil]-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (71 mg) en una mezcla de piridina (45): ácido acético (45): anhídrido acético (10) (5 ml), a 90°C. Se añadió a esta disolución 1-(5-carboxipentil)-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato bruto, porción a porción a intervalos de 20 minutos, hasta que el análisis UV/Vis indicó una completa conversión de los componentes semiclorantes ($\lambda_{\text{máx.}} = 524, 430 \text{ nm}$) a producto colorante Cy5 ($\lambda_{\text{máx.}} = 653 \text{ nm}$). A continuación se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante HPLC (RPC18. Agua/metanol/trietilamina, a continuación agua/acetonitrilo/TFA).

15

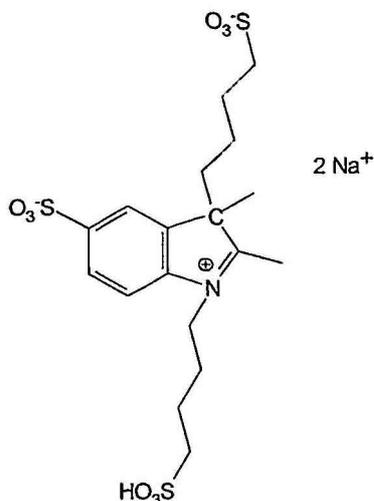
UV/Vis (Agua+0.1% de TFA): 653 nm.

MS (MALDI-TOF): encontrado 902. $\text{MH}^+ = \text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{S}_4$ requiere 901.

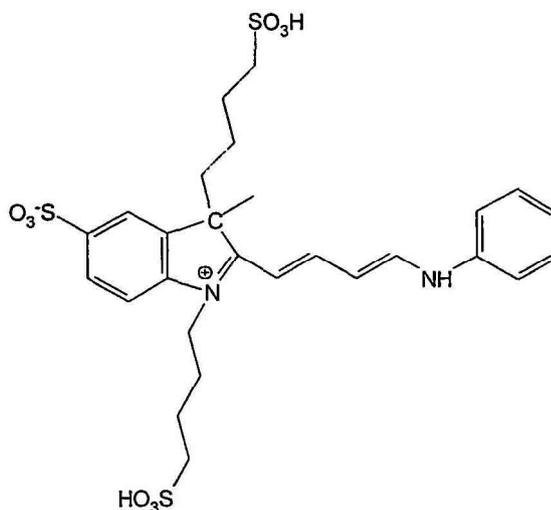
2. 2-[(1E,3E,5E)-5-[1-(5-Carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil]-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (Compuesto 2)



20

2.1 2,3-dimetil-1,3-bis(4-sulfonatobutil)-3H-indolio-5-sulfonato de disodio

- 5 2,3-Dimetil-3-(4-sulfonatobutil)-3H-indol-5-sulfonato de disodio (1,0 g) y 1,4-butanosulfona (10 ml) se mezclaron y calentaron con nitrógeno a 150°C durante 52 h, para dar una suspensión de color púrpura oscuro. Tras el enfriamiento, se trituró la mezcla con acetato de etilo: se recogió la porción sólida por filtración, se lavó con acetato de etilo y dietil éter, a continuación se secó con vacío elevado con pentóxido de fósforo para dar el producto del título (1,45 g), que se usó directamente son purificación.

2.2 2-[(1E,3E)-4-Anilino-1,3-dienil]-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato

- 10 Se calentaron con nitrógeno a 130°C durante 10 h 2,3-dimetil-1,3-bis(4-sulfonatobutil)-3H-indolio-5-sulfonato de disodio bruto (1,0 g) y clorhidrato de malonaldehído bis(fenilimina) (1,9 g) y ácido acético (10 ml) para dar una disolución de color naranja-tojo oscuro. A continuación se evaporó el disolventes a vacío; se repartió el residuo en una mezcla de agua / diclorometano / metanol. El análisis UV/Vis (etanol) confirmó la presencia del producto en la capa acuosa superior ($\lambda_{\text{máx.}} = 524 \text{ nm}$) mientras que el material de partida del malonaldehído estuvo presente principalmente en la capa orgánica inferior ($\lambda_{\text{máx.}} = 384 \text{ nm}$). La capa acuosa se evaporó a vacío y se purificó mediante HPLC (eluyentes, agua/0,1 % de TFA y acetonitrilo/0,1% de TFA). Las fracciones que contenían el producto se vertieron y evaporaron, se criocongelaron a partir de la disolución acuosa, con secado final a vacío elevado con pentóxido de fósforo para dar e producto del título. Rendimiento 240 mg como una espuma de color rojo.

UV/Vis (Agua+0.1%TFA): 520 nm.

- 20 MS (MALDI-TOF): encontrado 627. $\text{MH}^+ = \text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_3$ requiere 627.

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ 0,65 (1 H, m amplio), 0,95 (1 H, m amplio), 1,6 (2H, m), 1,7 (3H, s), 1,9 (4H, m), 2,3 (2H, m), 2,7 (2H, app t), 3,0 (2H, t), 4,1 (2H, app t), 6,4 (2H, m), 7,2-7,6 (6H, m), 7,8-8,0 (2H, m), 8,15 (1 H, t) y 8,2 (1 H, d).

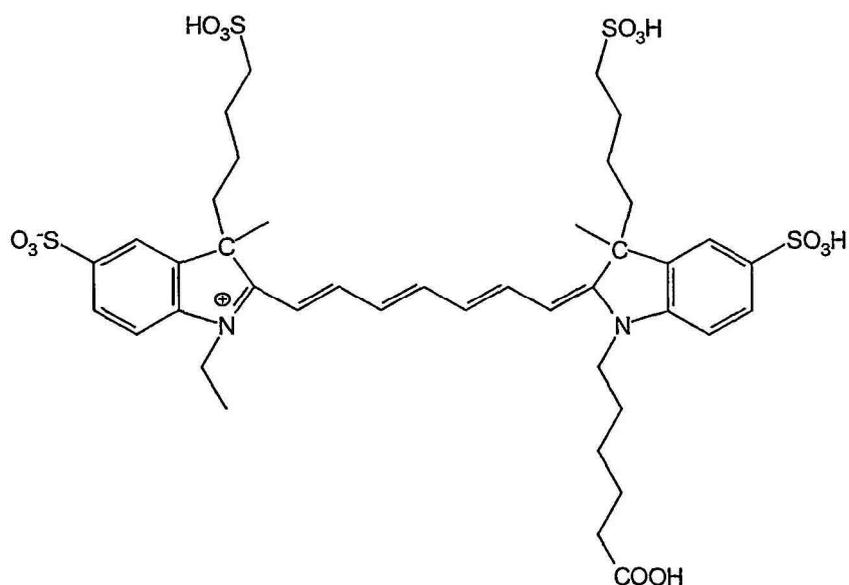
2.3 2-[(1E,3E,5E)-5-[5-carboxipentil]-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil]-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato

5 Se disolvió 2-[(1E,3E)-4-anilino-1,3-dienil]-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (70 mg) en una mezcla de piridina (45) : ácido acético (45) : anhídrido acético (10) (5 ml) a 90°C. Se añadió a esta disolución 1-(5-carboxipentil)-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato bruto, porción a porción a intervalos de 20 minutos, hasta que el análisis UV/Vis indicó la completa conversión de los componentes semicolorantes ($\lambda_{\text{máx.}} = 524, 430 \text{ nm}$) a producto colorante Cy5 ($\lambda_{\text{máx.}} = 656 \text{ nm}$). A continuación se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante HPLC (RPC18. Agua/acetronitrilo/TFA)

UV/Vis (Agua+0.1 % de TFA): 656 nm.

MS (MALDI-TOF): encontrado 1010. $\text{MH}^+ = \text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{S}_5$ requiere 1009.

3. 2-[(1E,3E,5E,7E)-7-[1-(5-Carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]hepta-1,3,5-trienil]-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (Compuesto 3)



15

La sal de 1-etil-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (110 mg) y monoclóhidrato de N-[5-(fenilamino)-2,4-penta-dienilideno] anilina (60 mg) se calentaron conjuntamente en una mezcla de ácido acético (5 ml), anhídrido acético (5 ml) y trietilamina (0,5 ml) a 120°C durante 30 min. Se añadieron a continuación a la mezcla de reacción 1-(5-carboxipentil)-2,3-dimeeil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (100mg) y piridina (5 ml), la mezcla de reacción se calentó durante 30 min más a 120°C. En el enfriamiento, la mezcla de reacción de color verde oscuro se vertió en un exceso de acetato de etilo (250 ml) y el sólido resultante se eliminó mediante filtración, se lavó con acetato de etilo y se secó. El producto se purificó mediante HPLC (proteína y péptido Vydac C18 (250mm x 25mm); caudal; 10 ml/min; gradiente de 5 a 15% de B durante 30 min; eluyente A = 0,1% de trietilamina en agua y eluyente B = 0,1 % de trietilamina en metanol; detección a 650 nm y a continuación cambio del gradiente de 2 a 25% de B durante 30 min; eluyente A = 0,1% de TFA en agua y eluyente B = 0,1% de TFA en acetronitrilo). Las fracciones que contenían el producto deseado se vertieron y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo el producto como un sólido de color verde oscuro (7 mg).

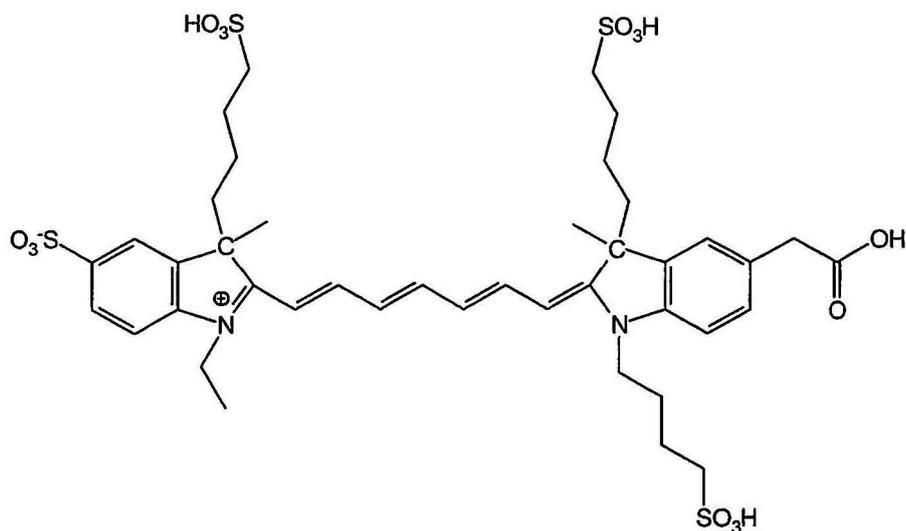
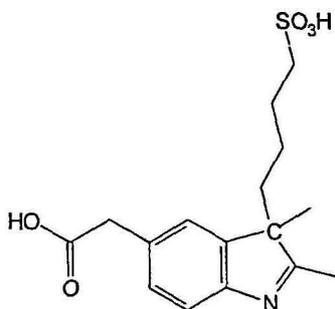
20

25

LC-MS (ES+): encontrado 927. $\text{MH}^+ = \text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{S}_4$ requiere 927.

UV/Vis; $\lambda_{\text{máx.}}$ 754nm (tampón PBS).

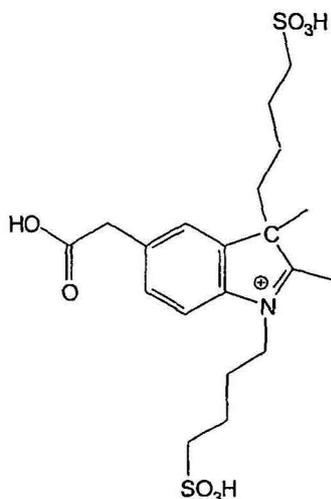
30

4. 2-((1E,3E,5E,7E)-7-[5-(Carboximetil)-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]hepta-1,3,5-trienil)-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (Compuesto 4)5 4.1 Ácido [2,3-Dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indol-5-il]

Clorhidrato de 4-(carboximetil) fenilhidrazina (5 g, 0,025 mol) y ácido 5-metil-6-oxoheptano-1-sulfónico (5 g, 0,024 mol) se calentaron conjuntamente en ácido acético a 140°C durante 5 h y a continuación se enfriaron a TA. La mezcla de reacción se filtró para eliminar cualquier material particulado y a continuación se eliminó el ácido acético a presión reducida para dejar un residuo de color marrón oscuro. Se disolvió el residuo en agua y se volvió a filtrar para eliminar una impureza de color marrón oscuro. El producto disuelto en agua se purificó mediante HPLC (Prep AKTA; columna Phenomenex C18 (250 mm x 50 mm); caudal 100 ml/min; gradiente de 0 a 100% de B durante 30 min; eluyente A = 0,1% de TFA en agua y eluyente B = 0,1% de TFA en acetonitrilo; detección a 220 nm). Las fracciones que contenían el producto deseado se vertieron y se eliminó el disolvente a presión reducida, a continuación, se criocongeló el residuo. Se obtuvo el producto como un sólido de color marrón tostado (4,14 g).

LC-MS (ES+) encontrado 340. $MH^+ = C_{16}H_{22}NO_5S$ requiere 340.

1H RMN (D_2O) δ 0,90 (m, 2H), 1,68 (m, 5H), 2,23 (m, 2H), 2,75 (m, 4H), 3,88 (s, 2H), 7,49, 7,64 (dd, 2H), 7,64 (s, 1H).

4.2 5-(Carboximetil)-2,3-dimetil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio

El ácido 2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indol-5-il]acético (0,89 g, 2,63 mmol) y acetato de sodio trihidrato (0,46 g) se disolvieron en metanol (30 ml) y se agitaron durante 10 min a TA. Se eliminaron los disolventes a presión reducida, se volvió a disolver el residuo en metanol (30 ml) y de nuevo se eliminó el disolvente a presión reducida para dar un residuo de color marrón pálido. Se añadió a este tetrametilsulfona (5 ml) y 1,4 butano sulfona (0,67 ml, 6,56 mmol). La mezcla de reacción se calentó con nitrógeno a 150°C durante 6 h; se separó un residuo de color púrpura oscuro alrededor del lateral del matraz. Se enfrió este a temperatura ambiente y se eliminó mediante vertido el sobrenadante, y se trituró el residuo con acetato de etilo para dar un sólido púrpura. Se eliminó el producto mediante filtración y se lavó con acetato de etilo (material muy higroscópico). Se disolvió el producto en agua que contenía 2% de TFA y se dejó reposar durante 12 h. Se purificó el producto mediante HPLC (columna C18 con proteína y péptido Vydac (250 mm x 25 mm); caudal, 10 ml/min; gradiente de 0 a 25% de B durante 30 min; eluyente A = 0,1% de trietilamina en agua y eluyente B = 0,1% de trietilamina en metanol; detección a 220 nm). Las fracciones que contenían el producto deseado se vertieron y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvo el producto como un residuo de color púrpura pálido (0,64 g)

LC-MS (ES+): encontrado 476. $M^+ = C_{20}H_{30}NO_8S_2$ requiere 476.

1H RMN (D_2O) δ 0,85 (m, 2H), 1,31 (t, 24H), 1,58 (s, 3H), 1,76 (m, 2H), 1,95 (q, 2H), 2,12 (m, 2H), 2,26 (m, 2H), 2,73 (t, 2H), 2,96 (t, 2H), 3,20 (q, 18H), 3,78 (s, 2H), 4,55 (t, 2H), 7,75, 7,78 (dd, 2H), 7,63 (s, 1 H).

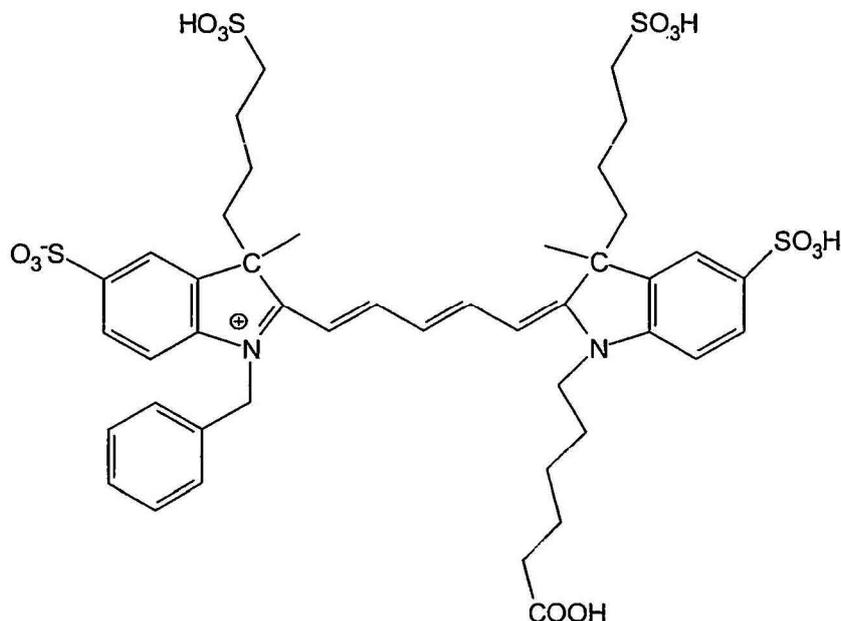
4.3 2-[(1E,3E,5E,7E)-7-[5-(Carboximetil)-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]hepta-1,3,5-trienil]-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato

5-(Carboximetil)-2,3-dimetil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio (640mg) y monohidrato de N-[5-(fenilamino)-2,4-pentadienilideno] (125 mg) se calentaron conjuntamente en una mezcla de ácido acético (5 ml), anhídrido acético (5 ml) y trietilamina (0,5 ml) a 120°C durante 40 min. A continuación se añadió a la mezcla de reacción la sal de 1-etil-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (825 mg (30% de pureza) y piridina (5 ml), se calentó la mezcla de reacción durante 40 min más a 120°C. En el enfriamiento, la mezcla de reacción de color verde oscuro se vertió en un exceso de acetato de etilo (500 ml) y el sólido resultante se eliminó mediante filtración, se lavó con acetato de etilo y se secó. El producto (950 mg) se purificó tal como se requirió usando HPLC (columna C18 con proteína y péptido Vydac (250mm x 25mm); caudal; 10 ml/min; gradiente de 15 a 30% de B durante 30 min; eluyente A = 0,1% de TFA en agua y eluyente B = 0,1% de TFA en acetonitrilo). Las fracciones que contenían el producto deseado se vertieron y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo el producto como un sólido de color verde oscuro (11,7 mg a partir de 150 mg de material bruto).

LC-MS (ES+): encontrado 927. $MH^+ = C_{41}H_{54}N_2O_{14}S_4$ requiere 927.

UV/Vis; $\lambda_{m\acute{a}x}$. 756 nm (tampón PBS).

5. 1-Bencil-2-[(1E,3E,5E)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-3-dienil]-1,3-dienil]-3-metil-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (Compuesto 5)



5.1 Sal de 1-bencil-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato

2,3-Dimetil-3-(4-sulfonatobutil)-3H-indol-5-sulfonato de disodio (5 g, 13,9 mmol) y acetato de sodio (3,11 g) se agitaron con metanol (100 ml) durante 1 hora. Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria, y se añadió una porción adicional de metanol (100 ml). Se eliminó este mediante evaporación rotatoria para dar como resultados un sólido pegajoso de color naranja. Se añadió a este sulfolan (25 ml) y bromuro de bencilo (9,51 g, 55,6 mmol, 4eq). Se agitó la mezcla durante la noche a 110°C bajo una capa de nitrógeno. La disolución de color rojo enfriada se vertió en acetato de etilo con agitación (1 l) y se eliminó el precipitado mediante filtración. Se lavó el precipitado con acetato de etilo y dietil éter copiosos y a continuación se secó a vacío. Se disolvió una muestra en agua y se analizó mediante TLC en fase inversa usando acetonitrilo modificado con TFA al 0,1%: agua modificada con TFA al 0,1% (30 : 70). La separación dio como resultado el producto (R_f 0,6) y el material de partida (R_f 0,95). La mancha del producto se volvió de color rojo en el reposo indicando que tuvo lugar la cuaternización. Rendimiento: 8 g.

5.2 1-Bencil-2-[(1E,3E,5E)-5-[-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil]-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato

La sal de 1-bencil-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (2 g), 1-(5-carboxipentil)-2,3-dimetil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato (2 g) y malonaldehído bis-fenilimina (2 g) se disolvieron en ácido acético: piridina: anhídrido acético (4,5:4,5:1) (100 ml). Se calentó la mezcla a 90°C durante 2 horas. La mezcla se volvió azul/verde inmediatamente. Se diluyó una pequeña muestra en agua para la medida del UV. La espectroscopía de absorción UV/Vis observó un pico a 650 nm que mostraba la formación de Cy5. La mezcla de reacción se almacenó durante la noche a +2°C. La mezcla se evaporó con evaporación rotativa para dar como resultado un aceite. Se bombeó este a vacío durante algunas horas para asegurar la sequedad. El sólido pegajoso se lavó con acetonitrilo (4x500 ml) para dar como resultado un polvo seco que se filtró y se lavó con más acetonitrilo. El sólido se secó a vacío. Rendimiento: 3,05 g.

Se disolvió el colorante en agua (7,5 ml), se filtró y se purificó mediante HPLC (Dynamax C₁₈ 42 mm x 25 cm) usando agua (0,1% de TFA) modificada con un gradiente 20 a 30% de acetonitrilo (0,1% de TFA) durante 60 minutos. El caudal fue de 20 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se evaporaron mediante evaporación rotatoria hasta un volumen pequeño, se transfirieron a una botella pequeña y se criocongelaron o/n. La detección UV/Vis fue a 650 nm. Rendimiento: 132 mg. A continuación se disolvió el material parcialmente purificado en agua (7,5 ml), se filtró y se purificó mediante HPLC (Dynamax C₁₈ 42 mm x 25 cm) usando agua (0,1% de TFA) modificada con 20 – 30% de acetonitrilo (0,1% de TFA) durante 60 minutos. El caudal fue de 20 ml/min.

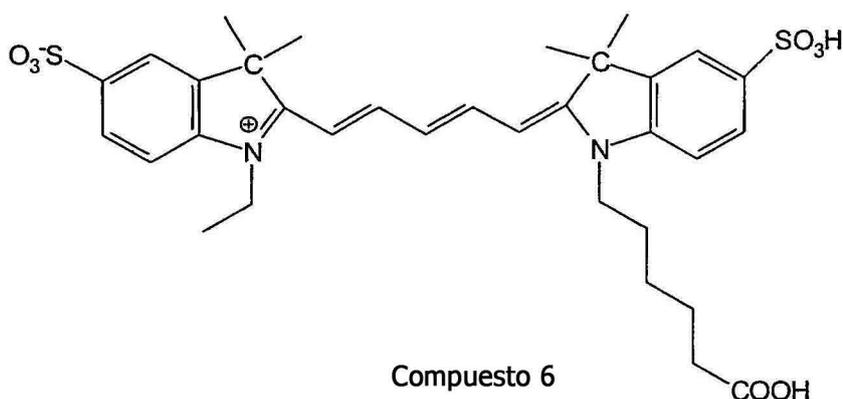
El análisis de la sonda mostró un coeficiente de extinción: $156175 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{máx}}$ 652 nm Emisión máxima de fluorescencia: 670 nm (exc 652 nm) y a una fluorescencia con una pureza: 99,6%.

5.3 Preparación del Compuesto 5, Éster NHS

Se disolvió 1-bencil-2-[(1E,3E,5E)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-

5 ilideno]penta-1,3-dienil]-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3*H*-indolio-5-sulfonato (5 mg) en DMSO (2,2 ml) y DIPEA (80 μ l) que contenían HSPyU (10 mg). La mezcla se cilindró durante 2 horas. Se dispensaron alícuotas de 400 μ l en tubos Sarstedt que contenían 1 ml de acetato de etilo seco. Se centrifugaron los tubos durante 15 minutos y se eliminó mediante decantación el acetato de etilo. El análisis de HPLC separó el producto de cualquier traza de materiales de partida, el ácido tuvo un tiempo de retención de 22,5 minutos y el éster 31,38 minutos con una pureza del 96,01% de éster NHS.

6. Estudio de marcado con colorantes Cy5. Comparación del compuestos 2 con Cy5TM (Compuesto 6)



6.1 Conversión de colorantes carboxilo en ésteres NHS

10 En tubos Sarstedt independientes, se mezclaron los Compuestos 2 y 6 (2,5 mg de cada uno) y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TSTU, 10 mg) con DMF anhidro (100 μ l). A continuación se añadió a ambas disoluciones resultantes N,N-diisopropiletilamina (10 mg). Se taparon los tubos, se sometieron a vortización y se dejaron reposar durante 1 h. Al final de este tiempo, las mezclas de reacción se diluyeron con acetato de etilo, se sometieron a vortización y a continuación se centrifugaron para recoger los ésteres NHS. Se decantaron los licores del sobrenadante; se lavaron los residuos con acetato de etilo reciente y se secaron a vacío. Se confirmó la reacción mediante el espectro de masas (MALDI-TOF).

Compuesto 2: C₄₅H₅₉N₃O₁₉S₅ requiere M⁺ = 1105; encontrado M⁺ = 1104.

Compuesto 6 (Cy5): C₃₇H₄₃N₃O₁₀S₂ requiere M⁺ = 753; encontrado M⁺ = 752.

6.2 Marcado de γ -globulina de oveja con los derivados de NHS de los colorantes Cy5 (Compuestos 2 y 6)

20 Se disolvió la IgG de oveja en tampón carbonato de sodio (0,1 M, pH 9,2) a 1 mg/ml; los ésteres colorantes NHS se disolvieron en DMSO anhidro a ~ 10 mg/ml (250 μ l). Con el fin de obtener una gama de relaciones de colorante/proteína, se llevaron a cabo una serie de experimentos de marcado. Cada reacción usó 500 μ l de disolución de anticuerpo, combinada con cantidades variables de disolución de éster colorante NHS, variando desde 0,1-32,0 μ l. Las reacciones de marcado se cilindraron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se retiró el colorante libre de los conjugados por purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex como fase estacionaria y solución salina tamponada con fosfato (PBS) de pH 7,4 como eluyente. Para las reacciones que usaban el compuesto 2, las fracciones de anticuerpos purificadas se sometieron adicionalmente a diálisis para asegurar la eliminación completa del colorante sin unir.

6.3 Caracterización de los conjugados mediante espectros de UV/Vis

30 Los espectros de absorbancia se midieron en primer lugar en las disoluciones netas de conjugados: en los casos en los que la absorbancia del colorante excedió el intervalo lineal del instrumento (~ 1,5 AU), se preparó una muestra más diluida usando PBS y las lecturas se escalaron apropiadamente. Se registraron los valores de la absorbancia en el pico de absorción del colorante (~650 nm) y en la absorbancia del anticuerpo (280 nm).

Se calcularon las relaciones de colorante/proteína usando la fórmula normalizada:

$$D/P = \frac{A_{m\acute{a}x.} \cdot \epsilon_{AB}}{(A_{280} - x \cdot A_{m\acute{a}x.}) \cdot \epsilon_D}$$

35

- $A_{\text{máx.}}$ = la absorbancia en la longitud de onda del pico del colorante (~650 nm),
- ϵ_D = el coeficiente de extinción del colorante en la longitud de onda del pico del colorante (~250.000 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹),
- A_{280} = la absorbancia a 280 nm (el pico de absorbancia del anticuerpo),
- χ = el coeficiente de extinción del colorante a 280 nm, relativo al coeficiente de extinción del pico del colorante (determinado mediante análisis matemático de los resultados y mediante análisis espectral de los colorantes puros = 0,05),
- ϵ_{AB} = El coeficiente de extinción del anticuerpo a 280 nm (determinado mediante experimento que va a ser 170.000 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹).

Los resultados se procesaron para ambos colorantes y se mostraron en forma de representaciones gráficas de (relación de colorante/proteína) frente a (cantidad de colorante NHS aplicado). Estas representaciones gráficas se muestran en la Figura 1 (1A y 1B). Se puede observar que las eficiencias de marcado de los dos colorantes son comparables.

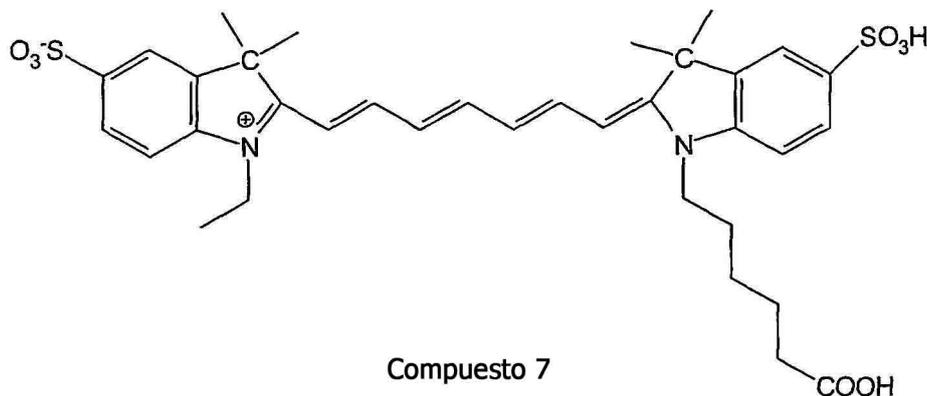
- 5 Las disoluciones conjugadas se diluyeron con PBS (200 μ l de conjugado en 20 ml) y la lectura de la fluorescencia se llevó a cabo en un instrumento LS-55 de Perkin Elmer. La excitación fue a la longitud de onda del pico de absorbancia; se registró la emisión a 680 nm. Se procesaron las lecturas iniciales de la fluorescencia para tener en cuenta la concentración real de anticuerpo en cada muestra, tal como se determinó a partir de los datos de la absorbancia. Las lecturas de ambos conjuntos de conjugados se escalaron de esta manera hasta una concentración constante de anticuerpo; a continuación se representó gráficamente la fluorescencia relativa frente a la relación colorante/proteína: Figura 2.

- 15 Los resultados indican que los conjugados del Compuesto 2 con la proteína IgG son más brillantes a cargas mayores de colorante que el Cy5 estándar (Conjugados de IgG del Compuesto 6). La razón de esta diferencia en el rendimiento se atribuye a una marcada disminución en la tendencia de los colorantes a asociarse mediante agregación, cuando se unen en estrecha proximidad entre sí. Esta reducción en la agregación se puede explicar por dos factores. En primer lugar, la carga negativa aumentada de cada colorante produce un aumento en la repulsión carga-carga, que actúa para contrarrestar la atracción normal de los sistemas aromáticos planares debida a las interacciones de apilamiento π - π . En segundo lugar, el mayor volumen estérico de los nuevos colorantes actúa para bloquear la cercana aproximación de las moléculas de colorante, evitando además la interacción de apilamiento.

- 20 Se puede observar la reducción en la agregación del colorante mediante los espectros de la absorbancia de los conjugados. Se sabe que la agregación de los colorantes de cianina en disolución conduce a un aumento de la absorbancia del hombro de alta energía en el pico de absorción principal. Este efecto es claramente visible en los espectros de absorción de los conjugados de Cy5TM, llegando a ser más pronunciado a medida que aumenta la relación de colorante/proteína; véase la Figura 3A. En contraste, los espectros de absorción equivalente de los conjugados del Compuesto 2 no muestran este efecto; la banda de absorción del colorante de los conjugados es esencialmente independiente de la relación colorante/proteína y los espectros son superponibles: véase la Figura 3B.

7. Estudio de marcado con colorantes Cy7; comparación de los Compuestos 3 y 4 con Cy7 (Compuesto 7)

Se comparó el rendimiento de los ejemplos de colorante con heptametina cianina de la invención con el derivado de Cy7 comercialmente disponible, (Compuesto 7).



7.1 Conversión de los colorantes con carboxilo a ésteres NHS

Los compuestos 3 y 4 se convirtieron a sus derivados de ésteres NHS usando el procedimiento del Ejemplo 6.1

Compuesto 3: $C_{45}H_{58}N_3O_{16}S_4$ requiere $M^+ = 1024$; encontrado $M^+ = 1024$.

5 Compuesto 4: $C_{45}H_{58}N_3O_{16}S_4$ requiere $M^+ = 1024$; encontrado $M^+ = 1024$.

7.2 Marcado de γ -globulina de oveja con los derivados NHS de los colorantes de heptametina cianina: Compuestos 3, 4 y 7

10 Se disolvió la IgG de oveja en tampón carbonato de sodio (0,1 M, pH 9,2) a 1 mg/ml; los ésteres colorantes NHS se disolvieron en DMSO anhidro a ~10 mg/ml (250 μ l). Con el fin de obtener una gama de relaciones de colorante/proteína, se llevó a cabo una serie de experimentos de marcado. Cada reacción usó 500 μ l de disolución de anticuerpo, combinados con cantidades variables de disolución de éster colorante NHS, variando desde 0,5-16 μ l. Las reacciones de marcado se cilindraron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se retiró el colorante libre de los conjugados por purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex como fase estacionaria y solución salina tamponada con fosfato (PBS) de pH 7,4 como eluyente.

15 7.3 Caracterización de los conjugados mediante espectros de UV/Vis

Se midieron en primer lugar los espectros de la absorbancia en disoluciones netas de conjugados; en los casos en los que la absorbancia del colorante excedió el intervalo lineal del instrumento (~1,5 AU), se preparó una muestra más diluida usando PBS y las lecturas se escalaron apropiadamente. Se registraron los valores de la absorbancia en el pico de absorción del colorante (~750 nm) y a la absorbancia del anticuerpo (280 nm).

20 Se calcularon las relaciones de colorante/proteína usando la fórmula estándar proporcionada en el Ejemplo 6; Se tomó ϵ_D como 250.000 $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ y x como 0,04.

25 Como se observa en la Figura 4, la absorbancia de UV/Vis de los conjugados en PBS muestra que Cy7 (compuesto 7) dentro de las construcciones Cy7-IgG se va a agregar mucho a mayores relaciones de colorante/proteína tal como se indicó por la magnitud del hombro desplazado hacia el azul: Figura 4A. Se demostró que los conjugados de IgG de los Compuestos 3 y 4 no presentaban esta propiedad de agregación: Figura 4B.

7.4 Caracterización de los conjugados mediante fluorescencia

30 Se diluyeron disoluciones de UV/Vis adicionalmente con PBS con el fin de medir la fluorescencia relativa de los diferentes conjugados marcados con colorante con heptametina cianina. Se midió la fluorescencia relativa tal como se ha descrito en el Ejemplo 6.3 Y a continuación se representó gráficamente frente a la relación colorante/proteína: Figura 5. Los resultados indican que los conjugados de IgG con el Compuesto 3 y el 4 son más brillantes a cargas mayores de colorante que los conjugados de Cy7 6-IgG estándares.

8. Marcado de 2'-desoxiuridina-5'-trifosfato de aminoalilo con el Compuesto 2

35 8.1 Se disolvió aminoalil-dUTP en tampón carbonato (10 ml, pH 9,2). Se añadió a este N-trifluoroacetil aminoalilo N-hidroxisuccinimida (2 equivalentes) en acetonitrilo. Se agitó este a temperatura ambiente durante 4,5 horas. La HPLC analítica mostró la finalización de esta reacción. A continuación se añadió hidróxido de amonio (0,88 S. G., 10 ml) y se

agitó la mezcla durante la noche para dar como resultados aminohecanoil-aminoalil-dUTP: Se purificó este producto mediante HPLC en fase inversa.

8.2 Aminohecanoil-aminoalil-dUTP (1 mg) en DMSO (500 µl) y diisopropiletilamina (40 µl) se agitaron durante 15 minutos con nitrógeno en un matraz de fondo redondeado de 25 ml seco en horno. Se disolvió el Compuestos 2, éster NHS (1 mg) en DMSO (300 µl) y se añadió en una porción de la mezcla. Se enjuagó el vial con DMSO (200 µl) que se añadió también. Se añadió DMAP (~1 mg) y se agitó la mezcla durante 18 horas en la oscuridad con nitrógeno. Se analizó una muestra (25 µl 500 µl de tampón) usando HPLC analítica (Phenomenex Jupiter C18 10m 25x0.46cm) en tampón fosfato 0,05 M pH 5,6 modificado con un gradiente del 5 al 30% de acetonitrilo durante 30 minutos y un caudal constante de 1 ml/minuto. La detección de la muestra se llevó a cabo usando absorbancia a 254 nm y 650 nm. El cromatograma muestra el consumo de éster y amina para dar un nuevo producto con una R_T de 15,5 minutos. Se diluyó el producto con agua (1 ml) y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (HiTrap Q HP 5 ml) en tampón bicarbonato de trietil amonio 0,1 M modificado con 20 – 75% de tampón carbonato de trietil amonio 1 M durante 60 minutos. El caudal fue de 1 ml/min y la detección fue a 650 nm y 254 nm. Las fracciones correspondientes al pico principal se combinaron y se evaporaron en evaporador rotatorio con calor, se disolvieron en agua, y se criocongelaron.

15 9. Marcado del ADNc usando los compuestos 2 y 5

9.1 Marcado con la sonda de ADNc

Se marcó el ADNc usando los Compuestos 2 y 5 por medio de una técnica de marcado posterior en la que los derivados reactivos del éster NHS de los colorantes se acoplaron al ADNc para generar sondas de la micromatriz tal como se describe a continuación.

20 ARN mensajero purificado del músculo esquelético humano (1 µg) se convirtió en ADNc usando oligo-dT y cebadores aleatorios en presencia de aminoalil-desoxiUTP, desoxinucleótidos, transcriptasa inversa y tampón de reacción durante 1 hora a 42°C en reacciones de 20 µl siguiendo el protocolo normalizado reseñado en el CyScribe Post Labelling Kit (GE Healthcare). Se retiraron los nucleótidos sin incorporar y los tampones del ADNc sintetizado mediante la unión del ADNc en una matriz de perla de vidrio. Se eluyó el aminoalil-ADNc en agua.

25 El ADNc eluido se secó y se volvió a suspender en alícuotas de 0,1 M de tampón bicarbonato de sodio, pH 8,5 (40 µl) y se mezclaron alícuotas separadas con ésteres NHS reactivos de los Compuestos 2 y 5. Se usaron cantidades iguales de ADNc con 100-500 µg de los Compuestos 2 y 5 como sus ésteres NHS reactivos. Se llevó a cabo la reacción de acoplamiento en la oscuridad durante 1 hora 30 minutos, seguido por la purificación del ADNc marcado a partir del éster sin reaccionar usando una matriz de perla de vidrio. A fines de comparación, se marcó también una alícuota del ADNc con el Compuesto 6 (éster NHS de Cy5). Las sondas marcadas con el ADNc se purificaron y se determinaron los rendimientos tal como se ha descrito a continuación.

i) Cálculo del rendimiento del ADNc marcado

$$\text{Rendimiento}_{\text{ADNc}} = \text{ADN Abs}_{260 \text{ nm}} \times 37 \mu\text{g/ml} \times \text{Volumen Total de la Sonda (ml)}$$

35 ii) Incorporación del colorante

$$\text{Moles de colorante incorporados} = \frac{\text{Abs}_{\text{max}}}{\epsilon} \times \text{Volumen total de la sonda}$$

Abs_{max} = la absorbancia a la longitud de onda del pico del colorante (650 nm)

ε = Coeficiente de extinción del colorante a la longitud de onda del pico del colorante (250.000 mol⁻¹ cm⁻¹).

iii) Relación Nucleótido / Colorante

$$\text{Relación N / D} = \frac{\text{Rendimiento del ADNc (ng)} \times 1000}{\text{pmoles de sonda} \times 324,5}$$

40

El anterior cálculo supone un tamaño d sonda promedio de 1000 bases y un peso molecular promedio de dNMP en ADNc que va a ser de 324,5. En la Tabla 5, se muestran los resultados de las reacciones de marcado.

Tabla 5

| Compuesto N° | Cantidad | DO ₂₆₀ | DO ₆₅₀ | ADNc (ng) | Sonda pmoles | Relación N/D |
|--------------|----------|-------------------|-------------------|-----------|--------------|--------------|
| 2 | 100 µg | 0,395 | 0,170 | 1169 | 54 | 66 |
| 2 | 150 µg | 0,382 | 0,280 | 1131 | 90 | 39 |
| 2 | 200 µg | 0,380 | 0,400 | 1125 | 128 | 27 |
| 5 | 100 µg | 0,394 | 0,420 | 1166 | 134 | 27 |
| 5 | 150 µg | 0,384 | 0,520 | 1137 | 166 | 21 |
| 5 | 200 µg | 0,383 | 0,600 | 1134 | 192 | 18 |
| 5 | 200 µg | 0,352 | 0,564 | 1042 | 180 | 18 |
| 6 | 20 µg | 0,320 | 0,260 | 947 | 83 | 35 |
| 6 | 20 µg | 0,287 | 0,260 | 850 | 83 | 31 |

5 Aunque la eficiencia de marcado del compuesto 6 fue mayor que cualquiera de los Compuestos 2 y 5, esto fue superado añadiendo grandes cantidades de los últimos colorantes reactivos a la mezcla de marcado. El Compuesto 5 proporcionó mayores eficiencias de acoplamiento que el Compuesto 2, debido probablemente a la mejora de la estabilidad acuosa del Compuesto 5. Además, la presencia de varios grupos sulfonato en las estructuras de los colorantes de acuerdo con la presente invención parece disminuir la agregación de la sonda, tal como se indicó por una reducción en el pico de la absorbancia del hombro a 605 nm adyacente a los máximos de fluorescencia del colorante a 650 nm (véanse las Figuras 6 y 7). Esto está en contraste con la sonda de ADNc marcada con el Compuesto 6 que muestra un gran pico en el
10 hombro a 605 nm adyacente a los máximos a 650 nm (Figura 8).

10. Fotoestabilidad del colorante

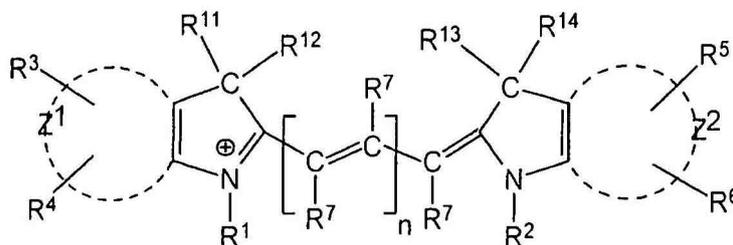
15 Los compuestos 2, 5 y 6 se diluyeron a -0,5 AU, volumen total de 10 ml en viales de centelleo. Los viales se colocaron en una caja de luz a una temperatura ambiente controlada a 20°C. Se midió la absorbancia en el UV a intervalos de 120 horas. En la Figura 9 se muestran los resultados, e indican que la fotoestabilidad de los colorantes con cianina que contienen múltiples grupos sulfonato unidos a la estructura del cromóforo está potenciada en comparación con los colorantes que contienen pocos de dichos grupos.

Se almacenaron también muestras por duplicados en las mismas condiciones, pero en la oscuridad. No se observaron cambio en la absorbancia UV en estas muestras.

20

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I):



(I)

en la que:

- 5 los grupos R^3 y R^4 están unidos a la estructura de anillo Z^1 y los grupos R^5 y R^6 están unidos a la estructura de anillo Z^2 y $n = 1, 2$ o 3 .

Z^1 y Z^2 representan independientemente los átomos de carbono necesarios para completar un anillo, o un sistema de dos anillos aromáticos bifusionados;

- 10 al menos uno de los grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 es el grupo $-E-F$ en el que E es un grupo separador que tiene una cadena de 1-20 átomos unidos seleccionados entre el grupo constituido por átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno y F es un grupo reactivo seleccionado entre éster de succinimidilo, éster de sulfo-succinimidilo, isotiocianato, maleimida, haloacetamida y fosforamidita;

uno o más de los grupos R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} que se seleccionan independientemente del grupo $-(CH_2)_k-W$, en el que W es ácido sulfónico o ácido fosfónico y k es un entero de 1 a 10;

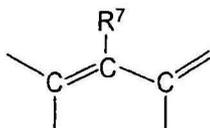
- 15 cuando cualquiera de los grupos R^1 y R^2 no es dicho grupo $-E-F$; dichos grupos R^1 y R^2 restantes se seleccionan independientemente entre alquilo $C_1 - C_6$, bencilo tanto no sustituido como sustituido con ácido sulfónico, y el grupo $-(CH_2)_k-W$,

en el que W y k son como se ha definido anteriormente en el presente documento;

- 20 cuando cualquiera de los grupos R^3 , R^4 , R^5 y R^6 no es dicho grupo $-E-F$, dichos grupos restantes R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente entre hidrógeno y ácido sulfónico;

cualquiera de los grupos R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} no es dicho grupo $-(CH_2)_k-W$, dichos grupos restantes R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} son independientemente alquilo $C_1 - C_6$;

los grupos restantes R^7 son hidrógeno o dos de R^7 junto con el grupo,



- 25 forman un sistema de anillo de hidrocarburo que tiene 5 o 6 átomos.

2.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que al menos dos de R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} son independientemente $-(CH_2)_k-W$, en el que W y k son como se ha definido anteriormente en el presente documento.

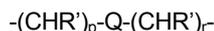
- 30 3.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que uno de los grupos R^{11} y R^{12} y uno de los grupos R^{13} y R^{14} es el grupo $-(CH_2)_k-W$, en el que W y k son como se ha definido anteriormente en el presente documento; y los grupos R^{11} o R^{12} y R^{13} o R^{14} restantes son alquilo $C_1 - C_6$.

4.- Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que W es ácido sulfónico.

5.- Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que $-(CH_2)_k-W$ se selecciona a partir de $-(CH_2)_3-SO_3H$ y $-(CH_2)_4-SO_3H$.

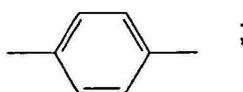
6.- Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que Z^1 y Z^2 se seleccionan entre restos de fenilo y naftilo.

5 7.- Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicho grupo separador E se selecciona entre:



en el que Q se selecciona entre: $-CHR^r-$, $-NR^r-$, $-O-$, $-CR^r=CR^r-$, $-Ar-$, $-C(O)-NR^r-$ y $-C(O)-O-$; R^r es hidrógeno o alquilo C_1-C_4 , p es 0 - 5 y r es 1 - 5.

10 8.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 en el que Q se selecciona entre: $-CHR^r-$, $-C(O)-NH-$ y



en la que R^r es como se ha definido anteriormente.

9.- Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que dicho grupo $-E-F$ comprende un grupo carboxipentilo..

15 10.- Un compuesto seleccionado entre:

i) 2- $\{(1E,3E,5E)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil\}-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato$;

ii) 2- $\{(1E,3E,5E)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil\}-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato$;

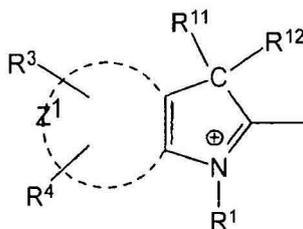
20 iii) 2- $\{(1E,3E,5E,7E)-7-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]hepta-1,3,5-trienil\}-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato$;

iv) 2- $\{(1E,3E,5E,7E)-7-[5-(carboximetil)-3-metil-1,3-bis(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]hepta-1,3,5-trienil\}-1-etil-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato$; y

25 v) 1-bencil-2- $\{(1E,3E,5E)-5-[1-(5-carboxipentil)-3-metil-5-sulfo-3-(4-sulfobutil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno]penta-1,3-dienil\}-3-metil-3-(4-sulfobutil)-3H-indolio-5-sulfonato$.

11.- Un procedimiento para preparar un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo el procedimiento:.

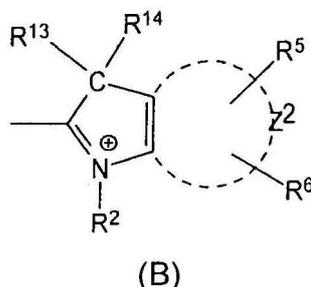
a) hacer reaccionar un primer compuesto intermedio que tiene la fórmula (A):



(A)

30 en la que Z^1 , R^1 , R^3 , R^4 , R^{11} y R^{12} son como se ha definido anteriormente en el presente documento;

b) un segundo compuesto intermedio que puede ser igual o diferente del primer compuesto intermedio y que tiene la fórmula (B):

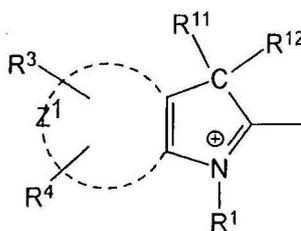


en la que Z^2 , R^2 , R^5 , R^6 , R^{13} y R^{14} son como se ha definido anteriormente, y

5 c) un tercer compuesto (C) adecuado para formar un enlace entre el primer y el segundo compuestos;

con la condición que al menos uno de los grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 sea el grupo -E-F, en el que E y F son como se ha definido en la reivindicación 1; y con la condición que uno o más de los grupos R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} se seleccionan independientemente del grupo $-(CH_2)_k-W$, en el que W se selecciona entre grupos de ácido sulfónico y ácido fosfónico y k es un entero de 1 a 10.

10 12.- Un compuesto de fórmula:



en la que:

los grupos R^3 y R^4 se unen a la estructura del anillo Z^1 , en el que Z^1 se ha definido anteriormente en el presente documento;

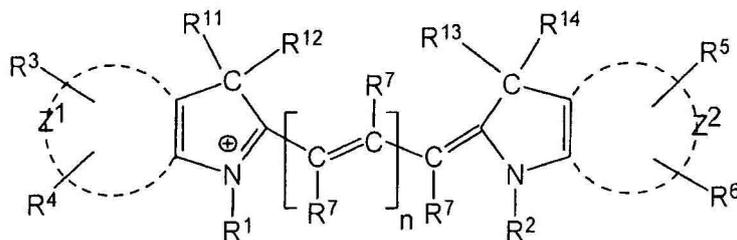
15 al menos uno de los grupos R^1 , R^3 y R^4 es el grupo -E-F en el que E y F se definen como en la reivindicación 1; y

al menos uno de los grupos R^{11} y R^{12} es el grupo $-(CH_2)_k-W$, en el que W se selecciona entre grupos de ácido sulfónico y ácido fosfónico y k es un entero entre 1 y 10.

13.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 en el que $-(CH_2)_k-W$ se selecciona entre $-(CH_2)_3-SO_3H$ y $-(CH_2)_4-SO_3H$.

20 14.- Un procedimiento para marcar un componente diana, comprendiendo el procedimiento:

i) poner en contacto dicho componente con un compuesto de fórmula (I)



(I)

en la que:

los grupos R³ y R⁴ se unen a la estructura del anillo Z¹ y los grupos R⁵ y R⁶ se unen a la estructura del anillo Z², y n = 1, 2 o 3;

5 Z¹ y Z² representan independientemente los átomos de carbono necesarios para completar un anillo, o un sistema de anillo aromático bifusionado;

al menos uno de los grupos R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ es el grupo -E-F en el que E y F son como se define en la reivindicación 1;

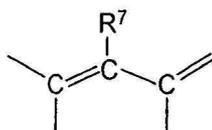
10 uno o más de los grupos R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ se seleccionan independientemente del grupo -(CH₂)_k-W, en el que W es ácido sulfónico o ácido fosfónico y k es un entero entre 1 y 10;

cuando cualquiera de los grupos R¹ y R² no es dicho grupo -E-F, dichos grupos R¹ y R² restantes se seleccionan independientemente entre alquilo C₁ - C₆, bencilo, tanto no sustituido como sustituido con ácido sulfónico, y el grupo -(CH₂)_k-W, en el que W y k son como se ha definido anteriormente.

15 cuando cualquiera de los grupos R³, R⁴, R⁵ y R⁶ no es dicho grupo -E-F, dichos grupos R³, R⁴, R⁵ y R⁶ restantes se seleccionan independientemente entre hidrógeno y ácido sulfónico;

cuando cualquiera de los grupos R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ no es dicho grupo -(CH₂)_k-W, dichos grupos R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ restantes son independientemente alquilo C₁ - C₆;

los grupos R⁷ restantes son hidrógeno o dos de R⁷ junto con el grupo,



20 forman un sistema de anillo hidrocarburo que tiene 5 o 6 átomos; e

(ii) incubar dicho colorante fluorescente con dicho componente en condiciones adecuadas para la unión y por tanto, marcar dicho componente.

25 15.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 en el que dicho componente se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo, lípido, proteína, péptido, carbohidrato, nucleótido, que contienen o se derivatizan para contener uno o más de un grupo amino, sulfhidrilo, carbonilo, hidroxilo y carboxilo y tiosulfato, y ácido oxi o desoxipolinucleicos que contienen o se derivatizan para contener uno o más de un grupo amino, sulfhidrilo, carbonilo, hidroxilo, carboxilo y tiosulfato, materiales microbianos, fármacos, hormonas, células, membranas celulares y toxinas.

30

Representaciones gráficas de la relación colorante/proteína frente a la cantidad de éster NHS aplicado, para el Compuesto 2 y el Compuesto 6

Compuesto 2

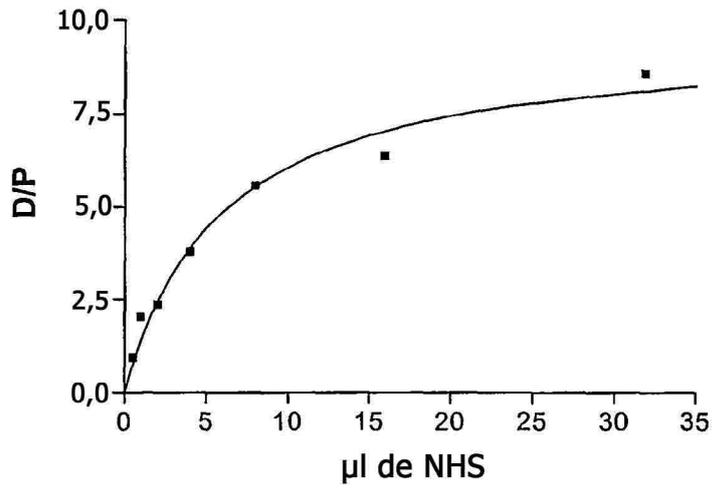


FIGURA 1A

Cy5™ – Compuesto 6

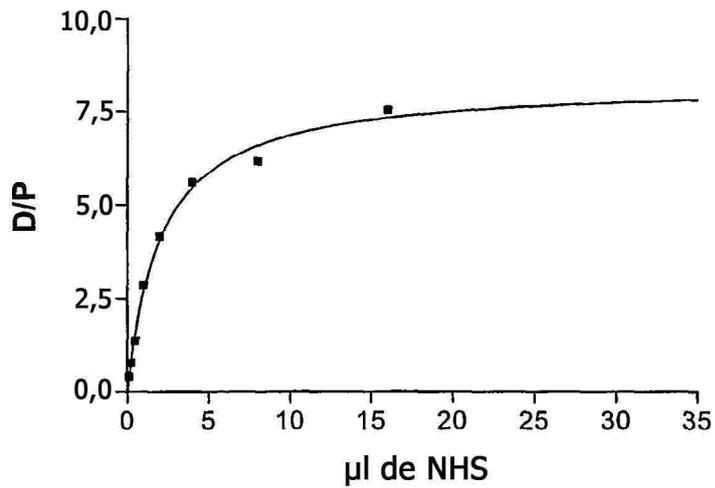


FIGURA 1B

Representación gráfica de la intensidad relativa de la fluorescencia frente a relación de colorante/proteína, a una concentración constante de anticuerpo, para colorantes con pentametina cianina

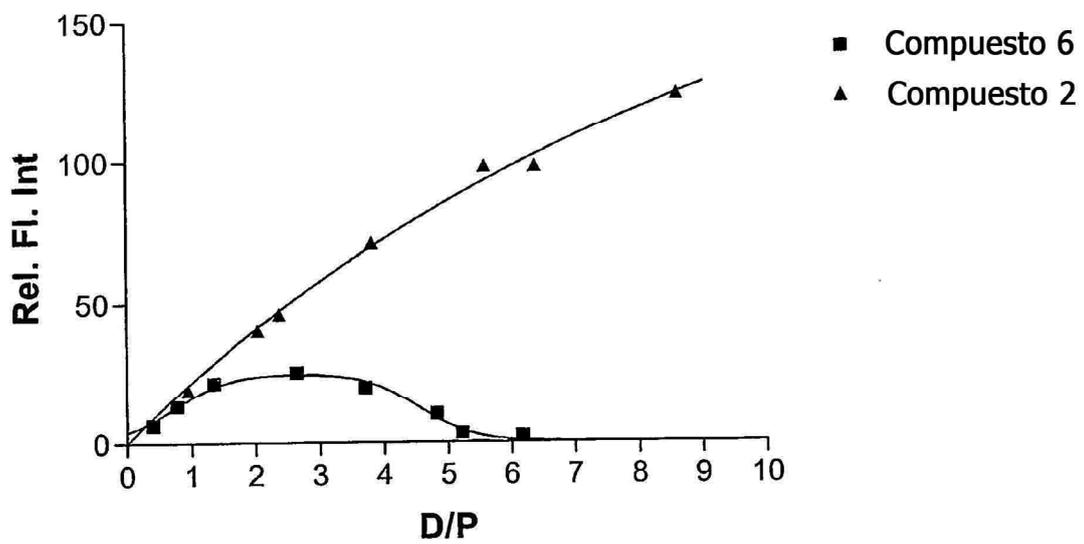


FIGURA 2

Espectros de absorción de los conjugados de IgG del Compuesto 6 y del Compuesto 2 a relaciones bajas y altas de colorante/proteína

Análisis UV/Vis de los conjugados de IgG del Compuesto 6

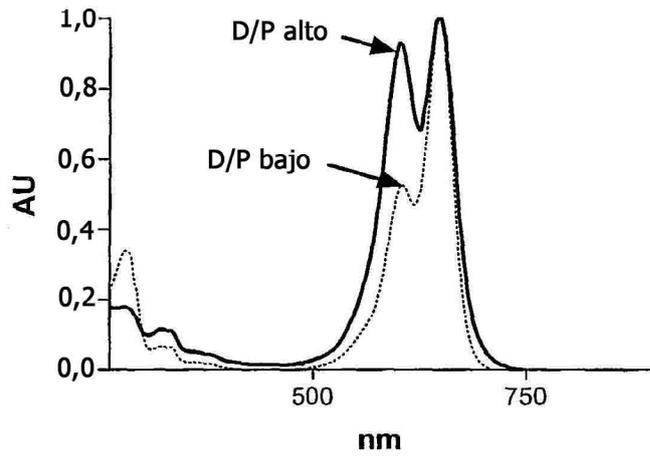


FIGURA 3A

Análisis UV/Vis de los conjugados de IgG del Compuesto 2

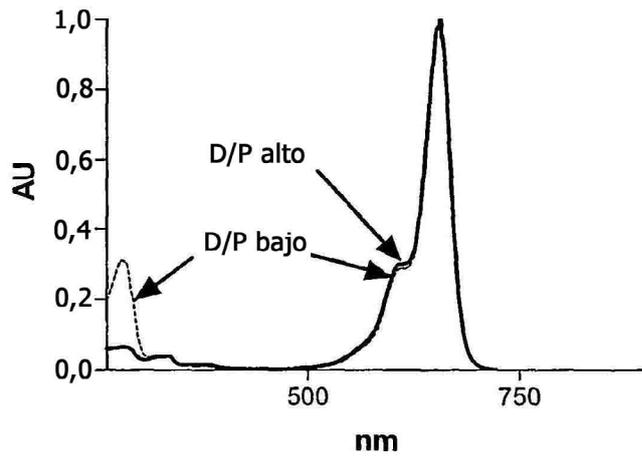


FIGURA 3B

Espectros de absorción de los conjugados de IgG del Compuesto 7 en comparación con relaciones altas de colorante/proteína de los Compuestos 3 y 4

Análisis UV/Vis de los conjugados de IgG del Compuesto 3 y de los conjugados de IgG del Compuesto 7

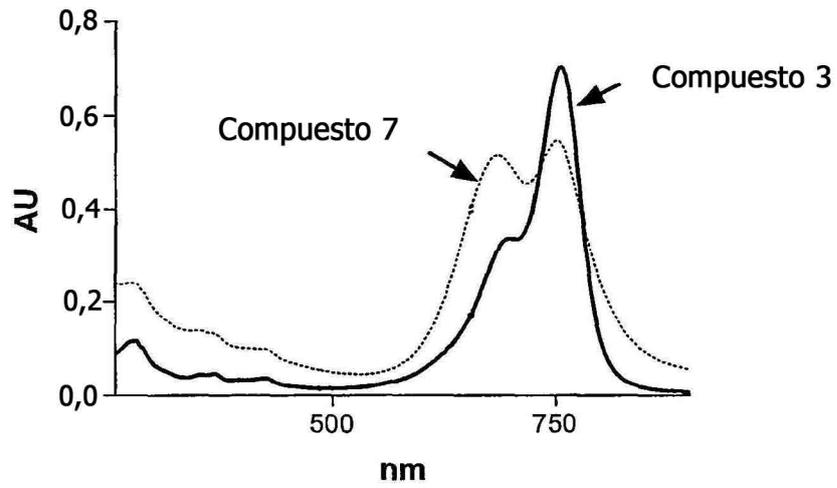


FIGURA 4A

Análisis UV/Vis de los conjugados de IgG del Compuesto 4 y de los conjugados de IgG del Compuesto 7

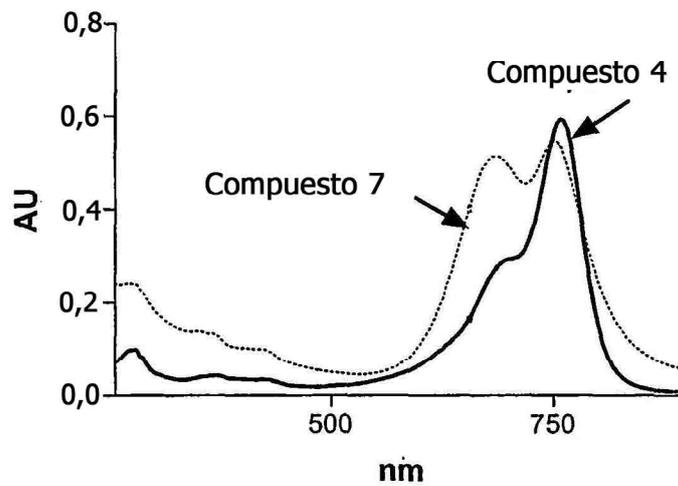


FIGURA 4B

Representación gráfica de la intensidad relativa de la fluorescencia frente a la relación de colorante/proteína para los colorantes con heptametina cianina

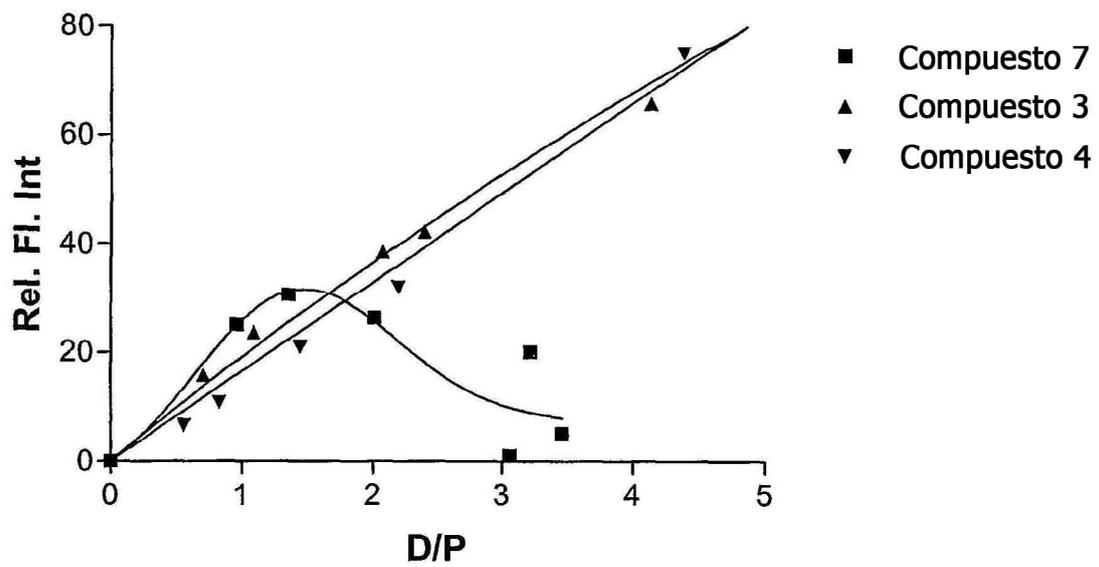


FIGURA 5

Barrido espectral (200 - 700 nm) de ADNc marcado con el Compuesto 2

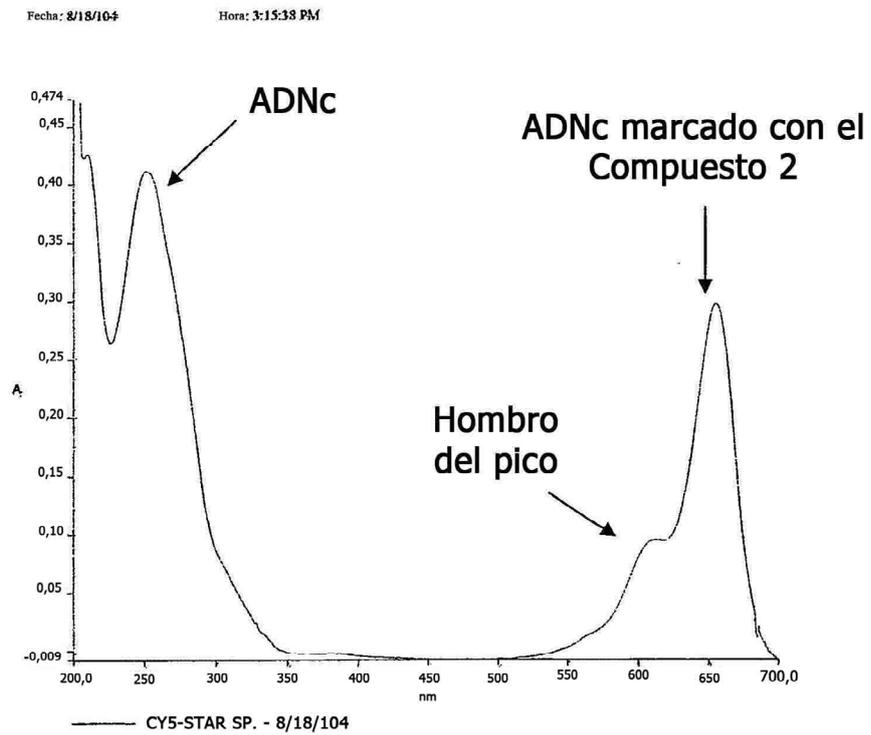


FIGURA 6

Barrido espectral (200 -700 nm) de ADNc marcado con el Compuesto 5

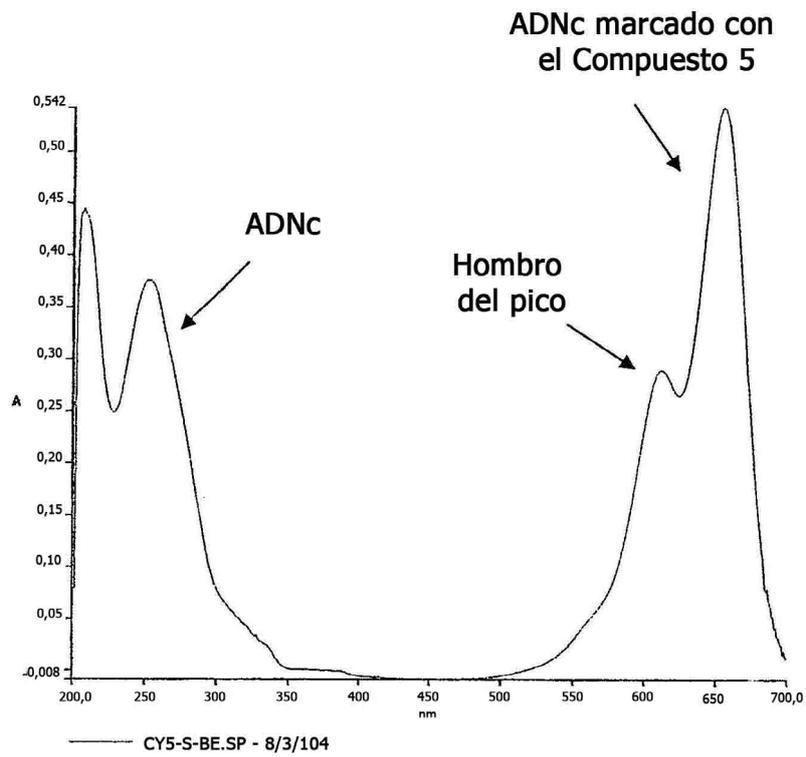


FIGURA 7

Barrido espectral (200 -700 nm) de ADNc marcado con el Compuesto 6

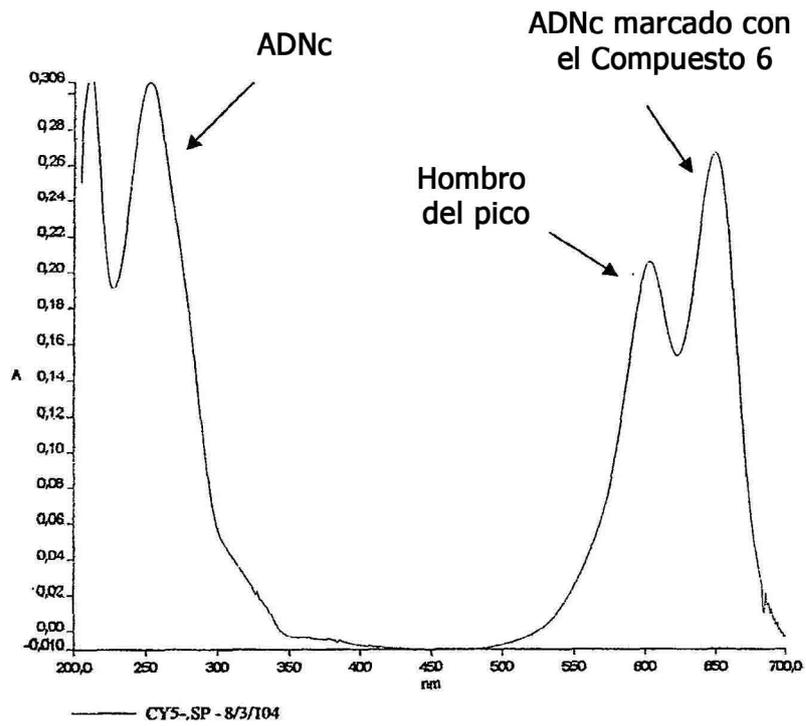


FIGURA 8

Estudios de fotoestabilidad del Compuestos 2 y del Compuesto 5
(frente al Compuesto 6)

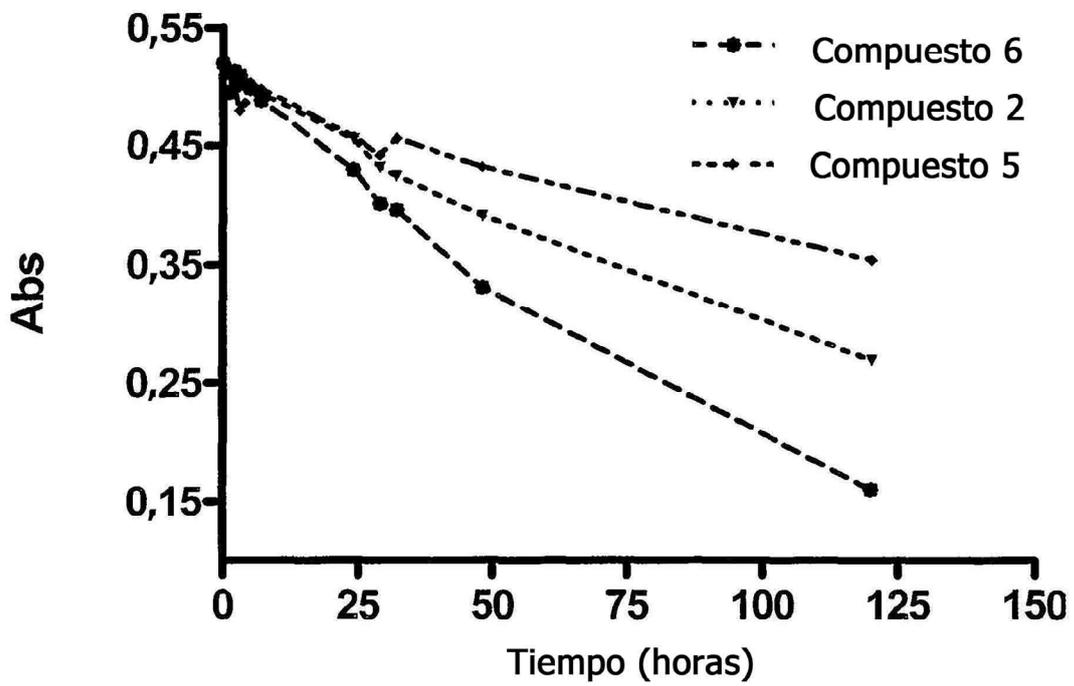


FIGURA 9