

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 380**

51 Int. Cl.:

C07D 405/04 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

C07D 409/04 (2006.01)

C07D 409/14 (2006.01)

C07D 417/04 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010 E 10158457 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2236508**

54 Título: **7-Hidroxycumarinas sustituidas con heterociclo reactivas y sus conjugados**

30 Prioridad:

01.04.2009 US 165862 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2015

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**DIWU, ZHENJUN;
DUBROVSKY, TIMOTHY;
ABRAMS, BARNABY;
LIAO, JINFANG y
MENG, QINGLIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 548 380 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

7-Hidroxycumarinas sustituidas con heterociclo reactivas y sus conjugados

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere a productos químicos fluorescentes, incluyendo tintes reactivos, a conjugados de tinte y a sus usos.

Descripción de la técnica relacionada

10 Las sondas fluorescentes específicas de analito son reactivos útiles para el análisis de analitos en una muestra. Los analitos se marcan mediante unión específica a las sondas, y el marcaje facilita la detección del analito. Las aplicaciones de sondas fluorescentes para el análisis de analitos en una muestra incluyen inmunoensayos de fluorescencia, incluyendo la identificación y/o separación de subpoblaciones de células en una mezcla de células por citometría de flujo, microscopía de fluorescencia y visualización de analitos separados en gel por tinción de fluorescencia. Estas técnicas se describen por Herzenberg *et al.*, "CELLULAR IMMUNOLOGY" 3ª ed., capítulo 22; Blackwell Scientific Publications (1978); por Goldman, "FLUORESCENCE ANTIBODY METHODS" Academic Press, Nueva York, (1968) y por Taylor *et al.*, "APPLICATIONS OF FLUORESCENCE IN THE BIOMEDICAL SCIENCES", Alan Liss Inc., (1986).

20 Cuando se emplean tintes fluorescentes con los fines anteriores, hay muchas consideraciones que afectan a la elección del tinte fluorescente. Una consideración es las características de absorción y emisión del tinte fluorescente, puesto que muchos ligandos, receptores y materiales de la muestra bajo ensayo, p.ej. sangre, orina y líquido cerebrospinal, tendrán fluorescencia e interferirán con una determinación exacta de la fluorescencia del marcador fluorescente. Este fenómeno se llama autofluorescencia o fluorescencia de fondo. Una segunda consideración es la capacidad de conjugar el tinte fluorescente con ligandos, receptores y otros materiales biológicos y no biológicos, y el efecto de dicha conjugación sobre el tinte fluorescente. En muchas situaciones, la conjugación con otra molécula puede dar como resultado un cambio sustancial en las características fluorescentes del tinte fluorescente y, en algunos casos, destruir sustancialmente o reducir la eficacia cuántica del tinte fluorescente. También es posible que la conjugación con el tinte fluorescente inactive la función de la molécula que está marcada. Una tercera consideración es la eficacia cuántica del tinte fluorescente, que es preferiblemente alta para una detección sensible. Una cuarta consideración es la capacidad de absorción de luz, o coeficiente de extinción, de los tintes fluorescentes, que es preferiblemente lo mayor posible. Una consideración adicional es si las moléculas fluorescentes interaccionarán entre sí cuando estén en estrecha proximidad, dando como resultado un autoapagamiento. Otra consideración es si hay unión no específica del tinte fluorescente a otros compuestos o las paredes del envase, por sí mismos o junto con el compuesto con el que está conjugado el tinte fluorescente.

35 La aplicabilidad y valor de los métodos indicados anteriormente están estrechamente ligados a la disponibilidad de compuestos fluorescentes adecuados. En particular, existe la necesidad de sustancias fluorescentes que puedan excitarse por fuentes de láser viables comerciales tales como láser violeta (405 nm), láser de argón (488 nm) y láser de He-Ne (633 nm). Hay muchos tintes fluorescentes desarrollados para láser de argón (excitación a 488 nm) y láser de He-Ne (excitación a 633 nm). Por ejemplo, la fluoresceína, que se excita bien por el láser de argón a 488 nm, es un emisor útil en la región verde. Sin embargo, hay pocos tintes fluorescentes disponibles para el láser violeta a 405 nm.

40 Ciertos tintes de cumarina han demostrado utilidad para una variedad de aplicaciones de detección biológica. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.207.404 de Miller *et al.*; la patente de EE.UU. nº 5.830.912 de Gee *et al.* y la patente de EE.UU. nº 4.956.480 de Robinson. En comparación con otros tintes fluorescentes tales como fluoresceínas, rodaminas y cianinas, muchos tintes de cumarina tienen ciertas propiedades ventajosas. El menor tamaño de los tintes de cumarina minimiza el efecto del tinte sobre la afinidad y especificidad de un reactivo específico de antígeno marcado con tinte. Además, las cumarinas menores tienen mayor eficacia de marcaje que fluoresceínas, rodaminas y cianinas. No obstante, muchos tintes de cumarina son conocidos por compartir ciertas desventajas, tales como un fuerte apagamiento de la fluorescencia de los tintes de hidroxycumarina conjugados con proteínas, debido a su fuerte hidrofobicidad y alto pKa. El apagamiento de fluorescencia de la cumarina es el resultado del autoapagamiento (distancia estrecha entre marcajes de cumarina) y/o por el apagamiento por residuos aminoácidos ricos en electrones (tales como histidina triptófano y tirosina, etc.). Además, la absorción típicamente débil a 405 nm de las cumarinas limita seriamente sus aplicaciones para analizar células usando un láser de excitación violeta, tal como el usado en algunos citómetros de flujo.

55 Se han usado cumarinas cloradas para marcar moléculas orgánicas pequeñas (p.ej., Zlokarnik *et al.*, 1998, Science 279: 84 y patente de EE.UU. nº 5.955.604). Para marcar moléculas orgánicas pequeñas, ni el autoapagamiento ni el apagamiento por el sustrato son un problema grave, porque solo está presente una sola molécula de cumarina en cada conjugado. En contraposición, para marcar anticuerpos, tanto el autoapagamiento como el apagamiento por el sustrato son un problema significativo, porque es deseable conjugar múltiples moléculas de tinte con cada anticuerpo. Se considera generalmente que la cloración de cumarinas o fluoresceínas daría como resultado un

marcaje inferior de los anticuerpos debido al denominado "efecto del átomo pesado" y la hidrofobicidad aumentada (patente de EE.UU. n° 5.516.629 de Park *et al.*; patente de EE.UU. n° 5830912 de Gee *et al.*; patente de EE.UU. n° 6.472.205 de Tsién y Zlokarnik; Haugland, "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes", 9ª ed., pág. 7-74, 2002).

5 La solicitud de patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente de n° de serie 12/220.939, presentada el 29/07/2008 (publicada como US 2010-0029017), describe anticuerpos conjugados con una pluralidad de tintes de 7-hidroxycumarina monoclorada y su uso en ensayos biológicos. Estos tintes de hidroxycumarina monoclorada exhiben inesperadamente un autoapagamiento reducido cuando se usan como marcadores de anticuerpo con múltiples tintes por anticuerpo. Estos anticuerpos marcados con tinte exhiben típicamente máximos de absorbancia cercanos a 405 nm y exhiben una emisión máxima en el azul.

10 El documento US 5.830.912 da a conocer 6,8-difluoro-7-hidroxycumarinas y derivados de 6,8-difluoro-7-hidroxycumarinas, incluyendo tintes reactivos, conjugados de tinte y sustratos enzimáticos. Estos tintes fluorescentes sustituidos con flúor poseen típicamente mayor fotoestabilidad y menor sensibilidad al pH en el intervalo de pH fisiológico que sus análogos no fluorados, exhiben menos apagamiento de fluorescencia cuando se conjugan con una sustancia, poseen espectros de absorción y emisión que coinciden estrechamente con los de sus análogos no fluorados y exhiben también mayores rendimientos cuánticos que sus análogos no fluorados.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles y derivados de tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles, incluyendo tintes reactivos y conjugados de tinte.

20 Los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles de la presente invención exhiben combinaciones novedosas de propiedades que hacen a estos tintes fluorescentes particularmente adecuados para uso en ensayos biológicos, incluyendo para uso como marcadores de biopolímeros. Se ha descubierto que la sustitución con heterociclo y la adición de grupos hidrosolubles a 7-hidroxycumarinas da como resultado inesperadamente una nueva clase de cumarinas fluorescentes útiles en ensayos biológicos y para preparar conjugados biológicos que tienen una fuerte absorción de 405 nm y son altamente fluorescentes. Además, la halogenación de 7-hidroxycumarinas sustituidas con heterociclo reduce significativamente el pKa de los tintes de cumarina, de modo que los conjugados de cumarina resultantes tienen su fluorescencia máxima en el intervalo de pH fisiológico. Estos tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo son fuertemente fluorescentes, y la intensidad de fluorescencia potenciada de los conjugados de tinte de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo de la invención da como resultado una mayor sensibilidad del ensayo.

30 Los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo de la invención exhiben típicamente máximos de absorbancia cercanos a 405 nm, y los tintes de la invención pueden seleccionarse para coincidir con las líneas de emisión principales de un láser violeta como se presenta, por ejemplo, en muchos citómetros de flujo. Es una ventaja particular de los tintes reactivos y conjugados de tinte de la presente invención que esta clase de tintes exhiben típicamente su emisión máxima en el verde (aproximadamente 500-540 nm). A nuestro entender, la presente invención proporciona la primera descripción de una clase de tintes fluorescentes de molécula pequeña que emiten en el verde y son útiles para marcar moléculas biológicas en condiciones de reacción de ensayo biológico típicas.

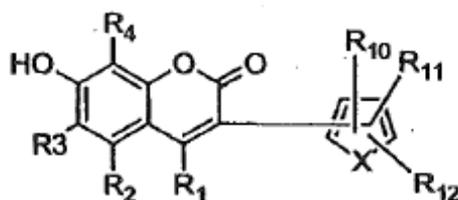
35 En un aspecto, la presente invención proporciona compuestos de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles químicamente reactivos útiles como tintes fluorescentes. Los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la invención pueden reaccionar con una amplia variedad de sustancias orgánicas o inorgánicas ("sustrato") que contienen o están modificadas para contener grupos funcionales con reactividad adecuada, dando como resultado la conjugación del tinte con la sustancia. En un aspecto de la invención, se usan los tintes reactivos de la invención para teñir o marcar fluorescentemente de forma directa una muestra, de modo que la muestra pueda detectarse, identificarse o cuantificarse.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona conjugados de tinte que comprenden una o más 7-hidroxycumarinas sustituidas con heterociclo hidrosolubles de la invención conjugadas con un sustrato que es un biopolímero o un anticuerpo. En realizaciones preferidas, se usan conjugados de tinte como reactivos de detección fluorescentes para detectar, identificar, localizar o cuantificar analitos en una muestra.

45 En una realización preferida de la invención, el sustrato de conjugado de tinte es un biopolímero, y el biopolímero se conjuga con una o más de las 7-hidroxycumarinas sustituidas con heterociclo hidrosolubles de la invención, obteniendo un biopolímero fluorescente. Los conjugados de tinte de biopolímero fluorescentes de la invención tienen utilidad como reactivos de detección, o como parte de ellos, incluyendo reactivos de detección específicos de analito. Los biopolímeros útiles incluyen, por ejemplo, polímeros aminoacídicos, polímeros de ácido nucleico, polisacáridos, carbohidratos y lípidos. En una realización preferida, el componente biopolimérico del conjugado de tinte-biopolímero es un polímero aminoacídico, como se define ampliamente en la presente memoria. En una realización preferida, el biopolímero es un anticuerpo monoclonal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que contienen los tintes reactivos o conjugados de tinte de la presente invención. Los kits de la presente invención pueden contener componentes adicionales útiles para llevar a cabo la aplicación pretendida, tales como otros reactivos o tampones.

5 Los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la invención tienen la estructura de fórmula 3:



en la que

X es O o S;

10 R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están sustituidos opcionalmente a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico L-RG o WSG; o alquilo o alcoxilo que están sustituidos opcionalmente a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico, L-RG o WSG;

15 RG es un grupo químicamente reactivo que es acrilamida, amina, ácido carboxílico, éster activado de ácido carboxílico, acilazida, acilnitrilo, aldehído, haluro de alquilo, anhídrido, haluro de arilo, azida, aziridina, boronato, diazoalcano, halogenoacetamida, halogenotriazina, hidrazina, hidroxilamina, imidoéster, isotiocianato, maleimida, complejo de platino reactivo, haluro de sulfonilo o derivado de psoraleno;

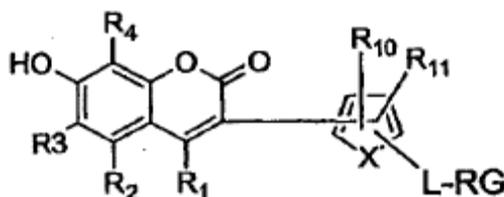
20 L es un ligador opcional que es nulo, alquilo, alcoxilo, tioalquilo, aminoácido, sulfoaminoácido, poliamina, polietilenglicol, arilo o heteroarilo;

WSG es un grupo hidrosoluble que es sulfonato, tiosulfato, fosfonato, boronato, amonio, piridio, quinolio o acridio;

al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ contiene L-RG; y

al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ es WSG.

25 En una realización preferida, los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la presente invención tienen la estructura de fórmula 4:



en la que

X es O o S;

30 R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

R₁₀ y R₁₁ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico, L-RG o WSG; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico, L-RG o WSG;

35 RG es un grupo químico reactivo como se define anteriormente;

L es un ligador opcional como se define anteriormente;

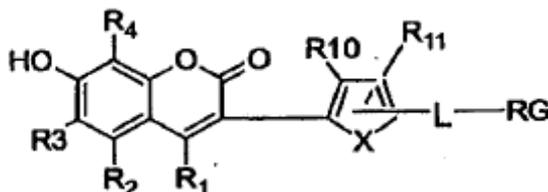
WSG es un grupo hidrosoluble como se define anteriormente;

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ contiene L-RG;

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es WSG; y

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ contiene un sulfonato.

- 5 En otra realización preferida, los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la presente invención tienen la estructura de fórmula 5:



en la que

X es O o S;

- 10 R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, cloro o fluoro;

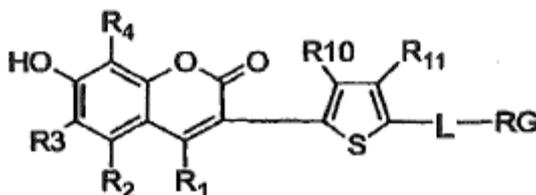
R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

RG es un grupo químico reactivo como se define anteriormente;

L es un ligador opcional como se define anteriormente, y

en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

- 15 En otra realización preferida, los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la presente invención tienen la estructura de fórmula 6:



en la que

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrogeno, cloro o fluoro;

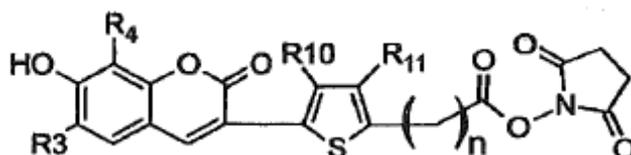
- 20 R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

RG es un grupo químico reactivo como se define anteriormente;

L es un ligador opcional que es nulo, alquilo, alcoxilo, tioalquilo, aminoácido, sulfoaminoácido, poliamina, polietilenglicol, arilo, arilalquilo o heteroarilo, y

en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

- 25 En otra realización preferida, los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la presente invención tienen la estructura de fórmula 7:



en la que

R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, cloro o fluoro;

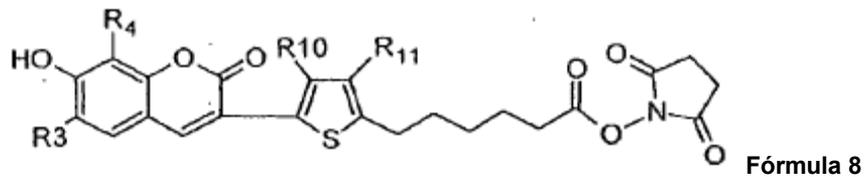
R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

n es un entero de 1 a 10; y

5 en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

Resultan evidentes realizaciones preferidas adicionales a partir de las reivindicaciones dependientes.

En otra realización preferida, los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la invención tienen la estructura de fórmula 8:



10 en la que

R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato; y

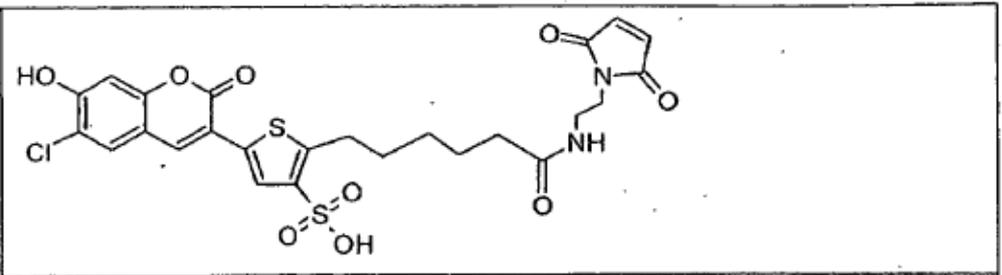
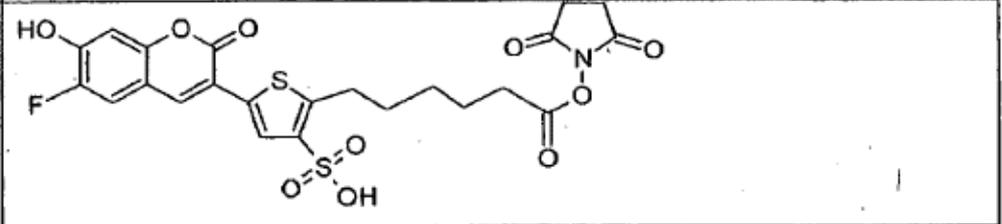
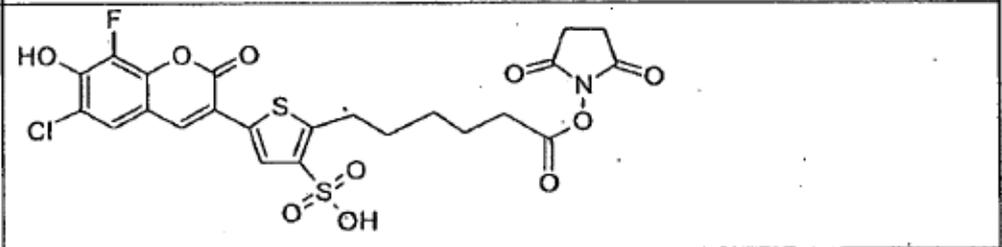
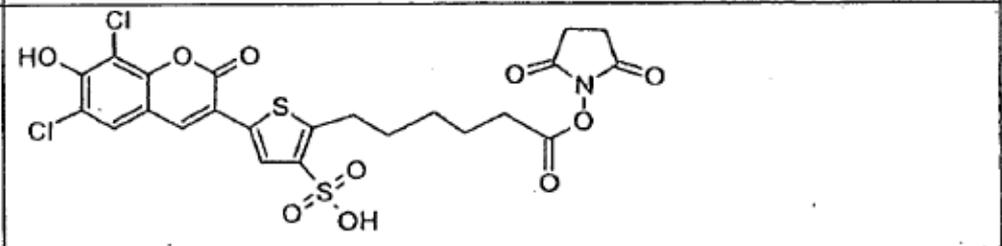
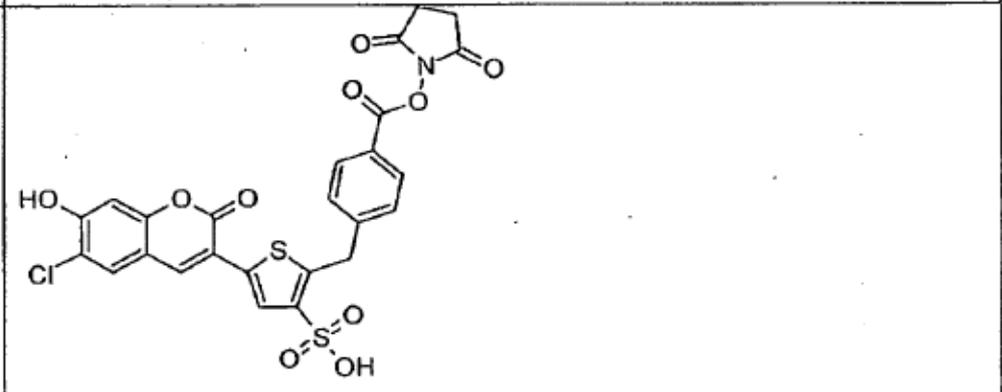
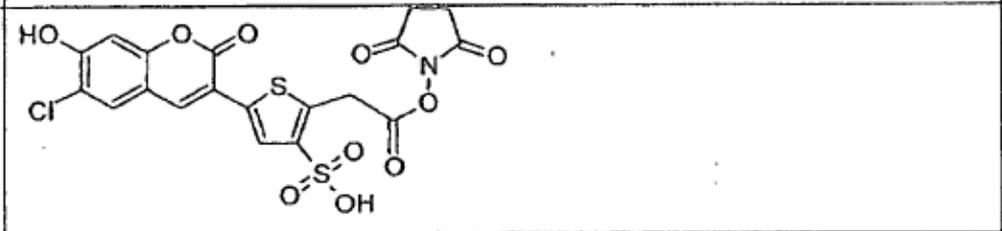
al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

Se dan en la Tabla 1 siguiente realizaciones seleccionadas de los tintes reactivos de la presente invención. El número de tintes reactivos de la Tabla 1 corresponde a la numeración de los compuestos descritos en los ejemplos.

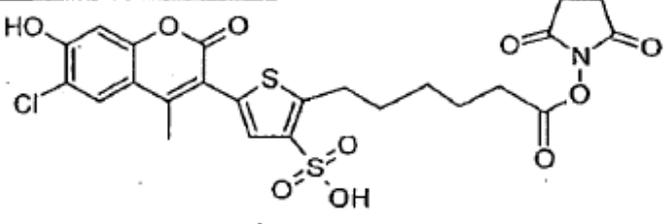
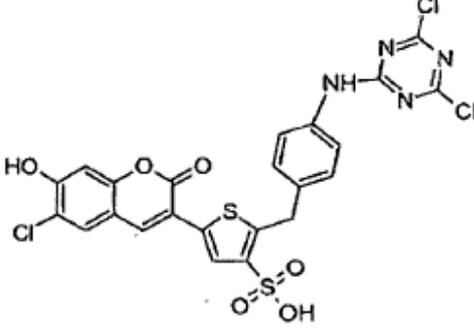
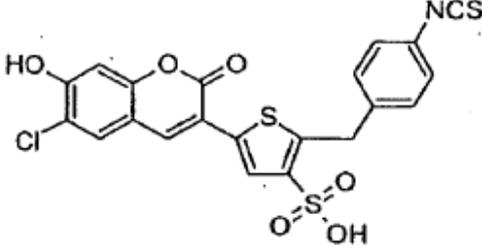
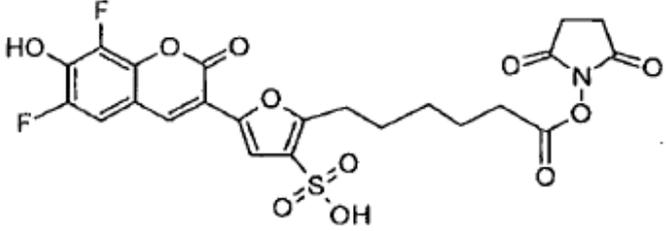
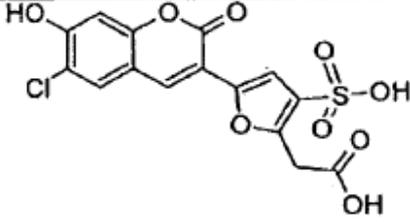
15 Tabla 1

Tintes reactivos ejemplares de la invención

Tinte	Estructura
6	
7	
8	

9	
13A	
14	
19	
25	
29	

<p>50</p>	
<p>56</p>	
<p>60</p>	
<p>66</p>	

<p>70</p>	
<p>72</p>	
<p>75</p>	
<p>77</p>	
<p>100</p>	

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

5 R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico o WSG; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico o WSG;

WSG es un grupo hidrosoluble que es un sulfonato, tiosulfato, fosfonato, boronato, amonio, piridio, quinolio o acridio;

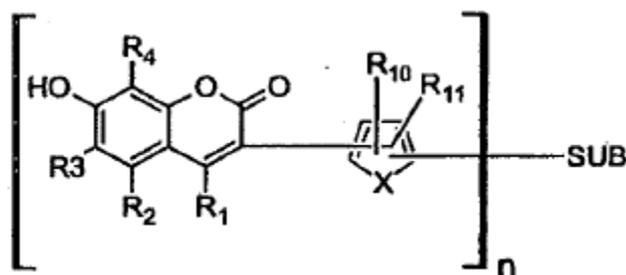
n es un entero de 1 a 35;

SUB es un sustrato que es un biopolímero o un anticuerpo;

10 al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ está unido covalentemente a SUB a través de un ligador opcional L, en la que L es nulo, alquilo, alcoxilo, tioalquilo, aminoácido, sulfoaminoácido, poliamina, polietilenglicol, arilo o heteroarilo; y

al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ es WSG.

En una realización preferida, los conjugados de tinte de la invención tienen la estructura de fórmula 12:



15 en la que

X es O o S;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

20 R₁₀ y R₁₁ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico o WSG; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico o WSG;

WSG es un grupo hidrosoluble como se define anteriormente;

n es un entero de 1 a 35;

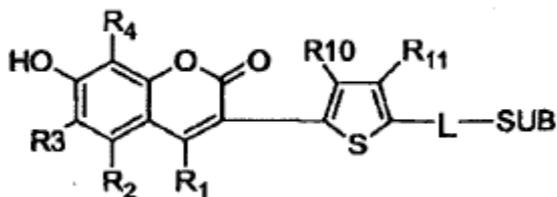
25 SUB es un sustrato como se define anteriormente;

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ está unido covalentemente a SUB a través de un ligador L opcional como se define anteriormente;

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es WSG; y

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ contiene un sulfonato.

30 En otra realización preferida, los conjugados de tinte de la invención tienen la estructura de fórmula 13:



en la que

X es O o S;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, cloro o fluoro;

R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

L es un ligador opcional como se define anteriormente;

5 SUB es un sustrato como se define anteriormente; y

en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

Adicionalmente, son evidentes realizaciones adicionales a partir de las reivindicaciones dependientes.

10 Las realizaciones preferidas de restos heterocíclicos, ligadores y grupos hidrosolubles son como se describen para los tintes reactivos anteriores. Además, la presente invención se refiere a un método de detección de un analito en una muestra que comprende

a) combinar dicha muestra con un reactivo de detección que comprende un conjugado de tinte de la presente invención en condiciones en las que dicho reactivo de detección forme un complejo con dicho analito;

b) detectar dichos complejos.

Descripción de los dibujos

15 La Figura 1 muestra un esquema de la síntesis de cumarinas reactivas por condensación catalizada por base (Método A) o por condensación basada en anhídrido acético (Método B) de 4-carbonilresorcinoles con compuestos de acetato heterocíclicos.

20 La Figura 2 muestra los espectros de absorción y emisión del compuesto 7 en tampón a pH= 9,0. El compuesto 7 tiene su máximo de absorción aproximadamente a 414 nm, que coincide muy bien con los 405 nm de excitación del láser violeta de un citómetro de flujo típico.

La Figura 3 muestra un gráfico de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD3 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte a proteína para marcar linfocitos.

La Figura 4 muestra un gráfico de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD4 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte a proteína para marcar linfocitos.

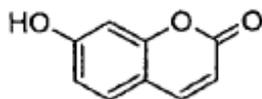
25 La Figura 5 muestra un gráfico de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD8 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte a proteína para marcar linfocitos.

La Figura 6 muestra un gráfico de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD45 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte a proteína para marcar linfocitos.

Descripción detallada de la invención

30 Para que la invención descrita en la presente memoria pueda entenderse más completamente, se definen explícitamente una serie de términos a continuación. Los términos no definidos explícitamente se pretende que tengan su significado habitual en los campos de la química y la biología.

35 El término "7-hidroxycumarina" o "derivado de 7-hidroxycumarina", como se usa en la presente memoria, por sí mismo o como parte de otro grupo, significa cualquier compuesto o sustituyente que contiene una o más de las siguientes estructuras de anillo condensadas o un derivado de las mismas:



7-Hidroxycumarina

40 Ha de entenderse que los tintes de cumarina de la invención se han dibujado en una u otra estructura de resonancia electrónica particular. Cada aspecto de la presente invención se aplica igualmente a tintes que se dibujan formalmente con otras estructuras de resonancia permitidas, ya que las cargas electrónicas en los tintes en cuestión están deslocalizadas a lo largo del tinte mismo.

El término "heteroátomo", como se usa en la presente memoria, por sí mismo o como parte de otro grupo, significa un átomo de oxígeno ("O"), un átomo de azufre ("S") o un átomo de nitrógeno ("N"). Se reconocerá que, cuando el heteroátomo es nitrógeno, puede formar un resto NR₁R₂, en que R₁ y R₂ son independientemente entre sí hidrógeno o alquilo, o junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un anillo saturado o insaturado de 5, 6 o 7 miembros.

El término “heterociclo” o “heteroarilo”, como se usa en la presente memoria, por sí mismo o como parte de otro grupo, hace referencia a grupos que tienen de 5 a 14 átomos de anillo y contienen átomos de carbono y 1, 2, 3 o 4 heteroátomos de oxígeno, nitrógeno o azufre. Los ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen grupos tienilo, benzo[*b*]tienilo, nafto[2,3-*b*]tienilo, tiantrenilo, furilo, piranilo, isobenzofuranilo, benzoxazolilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatiinilo, 2*H*-pirrolilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3*H*-indolilo, indolilo, indazolilo, purinilo, 4*H*-quinolizínilo, isoquinolilo, quinolilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, carbazolilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, isotiazolilo, fenotiazinilo, furazanilo, furazanilo y tetrazolilo). Los grupos heterocíclicos se han descrito extensamente en la bibliografía (véase, por ejemplo, Katritzky, Alan R., Charles W. Rees y Colin J. Drayton. 1984. “Comprehensive heterocyclic chemistry: the structure, reactions, synthesis, and uses of heterocyclic compounds”, volumen 8, parte 6. Índices. Oxford [Oxfordshire]: Pergamon Press.

Cualquier sistema de anillo arilo o heteroarilo puede estar no sustituido u opcional e independientemente sustituido con cualquier combinación sintéticamente accesible y químicamente estable de sustituyentes, tales como H, halógeno, ciano, sulfo, sal alcalina o de amonio de sulfo, nitro, carboxilo, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxilo, alquiltio, amino, monoalquilamino, dialquilamino o alquilamido, cuyas porciones de alquilo tienen 18 o menos carbonos.

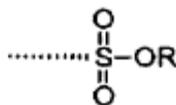
El término “sustituido”, como se usa en la presente memoria, hace referencia al reemplazo formal de un hidrógeno en un resto químico o grupo funcional por un radical alternativo. Cuando un compuesto, resto químico o grupo funcional se describe como sustituido, el resto sustituyente radical alternativo se selecciona generalmente del grupo consistente en hidroxilo, oxo, nitro, trifluorometilo, halógeno, alcoxilo, alquilendioxilo, aminoalquilo, aminoalcoxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxicarbonilamino, alcoxicarbonilo, carboxilo, hidroxialcoxilo, alcoxialcoxilo, monoalquilaminoalcoxilo, dialquilaminoalcoximono(carboxialquil)amino, bis(carboxialquil)amino, alcoxicarbonilo, alquínilcarbonilo, alquilsulfonilo, alquénilsulfonilo, alquínilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, alquilsulfínilo, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, alquilsulfonamido, carboxialcoxilo, carboxialquilo, carboxialquilamino, ciano, trifluoroetoxilo, perfluoroetoxilo, guanidina, amidino, oxiguanidino, alquilimino, formilimino, acilnitrilo, acilazida, acetilazida, diclorotriazeno, isotiocianato, haluro de sulfonilo, éster de sulfosuccinimidilo, isocianato, haluro de acilo, aldehído, halogenoacetamida, maleimido, aziridinilo, alquiltio (disulfuro), acrilóilo, halogenoalquilcarbonilo, boronato, hidrazida, semicarbazida, carbohidrazida, arilalquilo, heteroarilalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquénilalquilo y cicloheteroalquilalquilo.

Como se usa en la presente memoria, un “grupo reactivo” designado “RG” hace referencia a un resto en un compuesto que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional en un compuesto diferente formando un ligamiento covalente.

Como se usa en la presente memoria, se hace referencia a un “ligador”, designado “L”, entre dos restos como “opcional” si los dos restos pueden unirse directamente entre sí o a través del ligador como intermedio. Se usa este lenguaje para simplificar la descripción de estructuras alternativas que difieren solo por la presencia o ausencia del ligador. En la presente invención, por ejemplo, las moléculas de tinte de cumarina pueden conjugarse directamente con el biopolímero o, como alternativa, indirectamente con el biopolímero a través del ligador L. Por economía de notación, ambas alternativas se describen en la presente memoria por una sola estructura que tiene un ligador opcional. Una realización de una estructura que tiene un ligador L opcional en la que el ligador no está presente puede describirse como la estructura en que L es “nulo”.

El término “grupo hidrosoluble” o “WSG”, como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier sustituyente que potencie la hidrosolubilidad de un compuesto al que está unido. Preferiblemente, el grupo hidrosoluble WSG es un grupo sulfonato, tiosulfonato, fosfonato, boronato, amonio, piridio, quinolio, acridinio o polihidroxilo (p.ej. un azúcar tal como glucosa).

El término “sulfonato”, por sí mismo o como parte de otro grupo, hace referencia a cualquier compuesto o sustituyente que contenga uno o más restos que tienen la siguiente estructura:



en la que R es hidrógeno u otros contraiones, tales como un ión metálico o ión de amonio.

Como se usa en la presente memoria, el término “conjugado de tinte” hace referencia a un conjugado entre un tinte y un “sustrato” o “sustancia”.

El término “analito” se usa en la presente memoria ampliamente para hacer referencia a cualquier sustancia para analizar, detectar, medir o marcar. Los ejemplos de analitos incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, hormonas, haptenos, antígenos, anticuerpos, receptores, enzimas, ácidos nucleicos, polisacáridos, productos químicos, polímeros, patógenos, toxinas, fármacos orgánicos, fármacos inorgánicos, células, tejidos,

microorganismos, virus, bacterias, hongos, algas, parásitos, alérgenos, contaminantes y combinaciones de los mismos. Por convención, cuando se van a detectar células de un tipo celular dado, tanto las moléculas del componente celular como la célula misma pueden describirse como analito.

- 5 El término “reactivo específico de analito” o “reactivo específico de diana” se usa en la presente memoria ampliamente para hacer referencia a cualquier reactivo que se una preferencialmente a un analito o diana de interés respecto a otros analitos potencialmente presentes en una muestra. Una diana (analito) y un reactivo específico de diana (específico de analito) son miembros de un par de unión; y puede usarse cualquier miembro del par como reactivo específico de diana para unirse selectivamente al otro miembro del par. Los ejemplos de pares de diana y reactivo específico de diana incluyen, pero sin limitación, aquellos proporcionados en la Tabla 2 siguiente. Los reactivos específicos de diana preferidos son anticuerpos que incluyen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno.

Tabla 2

Pares de unión específica representativos

Antígeno	Anticuerpo
Biotina	Avidina, estreptavidina o anticuerpo anti-biotina
IgG (una inmunoglobulina)	Proteína A o proteína G
Fármaco	Receptor de fármaco
Toxina	Receptor de toxina
Carbohidrato	Lectina o receptor de carbohidrato
Péptido	Receptor de péptido
Nucleótido	Nucleótido complementario
Proteína	Receptor de proteína
Sustrato enzimático	Enzima
Ácido nucleico	Ácido nucleico
Hormona	Receptor de hormona
Psoraleno	Ácido nucleico
Molécula diana	Aptámero de ARN o ADN

- 15 Como se usa en la presente memoria, un “reactivo de detección” hace referencia a cualquier compuesto que se usa para facilitar la detección óptica de un analito. Un reactivo de detección comprende típicamente un reactivo específico de analito conjugado con un marcador fluorescente, e incluye tanto conjugados de tinte en que el componente de sustrato, típicamente un biopolímero, es por sí mismo un reactivo específico de analito, como reactivos específicos de analito unidos a un conjugado de tinte que funciona como marcador fluorescente.
- 20 Como se usa en la presente memoria, el término “biopolímero” se usa genéricamente para hacer referencia a polímeros aminoacídicos, polímeros de ácido nucleico, carbohidratos, polisacáridos y lípidos, cada uno como se define ampliamente en la presente memoria.
- 25 Como se usa en la presente memoria, el término “polímero aminoacídico” se usa genéricamente para hacer referencia a cualquier polímero de aminoácidos, incluyendo péptidos, polipéptidos y proteínas, incluyendo proteínas que se han sometido a modificación cotraduccional o postraduccional, tales como glicoproteínas. El polímero aminoacídico puede comprender tanto aminoácidos estándares (concretamente, uno de los 20 aminoácidos codificados por el código genético estándar, a los que se hace referencia también como proteínogénicos) como no estándares, y pueden estar derivatizados, protegidos o sustituidos tales como, por ejemplo, con fosfatos, carbohidratos o ácidos carboxílicos C₁ a C₂₅. Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan en la presente memoria intercambiabilmente sin distinción en cuanto a la longitud del polímero, aunque se hace referencia típicamente a los polímeros cortos de aminoácidos como péptidos o polipéptidos, y se hace referencia típicamente a los polímeros más largos de aminoácidos, particularmente aquellos que son de origen natural y/o tienen una función biológica, como proteínas.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” incluye todos los productos, derivados o derivables de anticuerpos o de genes de anticuerpos, que son útiles como reactivos de unión específica de diana. “Anticuerpo” incluye por tanto, entre otros, anticuerpos naturales, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpo y anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo genomanipulados.

5 Como se usan en la presente memoria, los términos “polímero de ácido nucleico”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” hacen referencia a polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), a polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y a cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un *N*-glicósido de una base de purina o pirimidina, o base de purina o pirimidina modificada. No se pretende una distinción en longitud entre los términos “ácido nucleico” y “oligonucleótido”, y estos términos se usarán intercambiabilmente. Estos términos hacen referencia solo a la estructura primaria de la molécula. Por tanto, estos términos incluyen ADN bicatenario y monocatenario, así como ARN bicatenario y monocatenario. Se pretende que los polímeros de ácido nucleico incluyan ácidos peptidonucleicos tales como unidades de *N*-(2-aminoetil)glicina (véase Nielsen *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.539.082).

Tintes reactivos

15 Las 7-hidroxycumarinas sustituidas con heterociclo hidrosolubles reactivas de la presente invención tienen la estructura general mostrada en cualquiera de las fórmulas 3-8. Se muestran en la Tabla 1 ejemplos particulares y se describen en los ejemplos.

Los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos contienen un grupo reactivo, RG, fijado covalentemente al tinte por un ligador L opcional. En ciertas realizaciones, el ligamiento covalente que fija el tinte al RG contiene múltiples átomos intermedios que sirven como espaciador.

20 Los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la invención pueden reaccionar con una amplia variedad de sustancias orgánicas o inorgánicas que contienen o están modificadas para contener grupos funcionales con reactividad adecuada, dando como resultado la fijación química al tinte de la sustancia. Típicamente, la reacción de conjugación entre el tinte reactivo y los grupos funcionales en la sustancia da como resultado que uno o más átomos del grupo reactivo RG se incorporen a un nuevo ligamiento que fija el tinte a la sustancia.

Típicamente, es un grupo reactivo un electrófilo o nucleófilo que puede formar un ligamiento covalente mediante exposición al correspondiente grupo funcional que es un nucleófilo o electrófilo, respectivamente. Se muestran en la Tabla 3 siguientes ejemplos seleccionados de pares reactivos de grupos electrófilos y nucleófilos junto con el ligamiento covalente resultante de su reacción.

Tabla 3

Grupos electrófilos y nucleófilos reactivos y los conjugados resultantes

Grupo electrófilo	Grupo nucleófilo	Conjugado resultante
Ésteres activados*	Aminas/anilinas	Carboxamidas
Acrilamidas	Tioles	Tioéteres
Acilazidas**	Aminas/anilinas	Carboxamidas
Acilamidas**	Aminas/anilinas	Carboxamidas
Haluros de acilo	Aminas/anilinas	Carboxamidas
Haluros de acilo	Alcoholes/fenoles	Ésteres
Acilnitrilos	Alcoholes/fenoles	Ésteres
Acilnitrilos	Aminas/anilinas	Carboxamidas
Aldehídos	Aminas/anilinas	Iminas
Aldehídos o cetonas	Hidrazinas	Hidrazonas
Aldehídos o cetonas	Hidroxilaminas	Oximas
Haluros de alquilo,	Aminas/anilinas	Alquilaminas
Haluros de alquilo	Ácidos carboxílicos	Ésteres

Grupo electrófilo	Grupo nucleófilo	Conjugado resultante
Haluros de alquilo	Tioles	Tioéteres
Haluros de alquilo	Alcoholes/fenoles	Éteres
Alquilsulfonatos	Tioles	Tioéteres
Alquilsulfonatos	Ácidos carboxílicos	Ésteres
Alquilsulfonatos	Alcoholes/fenoles	Éteres
Anhídridos	Alcoholes/fenoles	Ésteres
Anhídridos	Aminas/anilinas	Carboxamidas
Haluros de arilo	Tioles	Tiofenoles
Haluros de arilo	Aminas	Arilaminas
Aziridinas	Tioles	Tioéteres
Boronatos	Glicoles	Ésteres de boronato
Carbodiimidas	Ácidos carboxílicos	<i>N</i> -Acilureas o anhídridos
Diazoalcanos	Ácidos carboxílicos	Ésteres
Epóxidos	Tioles	Tioéteres
Halogenoacetamidas	Tioles	Tioéteres
Halogenoplatinatos	Amino	Complejo de platino
Halogenoplatinatos	Heterociclo	Complejo de platino
Halogenoplatinatos	Tiol	Complejo de platino
Halogenotriazinas	Aminas/anilinas	Aminotriazinas
Halogenotriazinas	Alcoholes/fenoles	Triaziniléteres
Imidoésteres	Aminas/anilinas	Amidinas
Isocianatos	Aminas/anilinas	Ureas
Isocianatos	Alcoholes/fenoles	Uretanos
Isotiocianatos	Aminas/anilinas	Tioureas
Maleimidias	Tioles	Tioéteres
Fosforamiditas	Alcoholes	Ésteres de fosfito
Haluros de sililo	Alcoholes	Sililéteres
Ésteres de sulfonato	Aminas/anilinas	Alquilaminas
Ésteres de sulfonato	Tioles	Tioéteres
Ésteres de sulfonato	Ácidos carboxílicos	Ésteres
Ésteres de sulfonato	Alcoholes	Éteres
Haluros de sulfonilo	Aminas/anilinas	Sulfonamidas
Haluros de sulfonilo	Fenoles/alcoholes	Ésteres de sulfonato

* Los ésteres activados, como se entiende en la materia, tienen generalmente la fórmula -COW, en que W es un buen grupo saliente (p.ej. succinimidiloxilo (-OC₄H₄O₂), sulfosuccinimidiloxilo (OC₄H₃O₂-SO₃H), 1-oxibenzotriazolilo (-

OC₆H₄N₃) o un grupo ariloxilo o ariloxilo sustituido una o más veces con sustituyentes extractores de electrones tales como nitro, fluoro, cloro, ciano o trifluorometilo o combinaciones de los mismos, usados para formar arilésteres activados; o un ácido carboxílico activado con una carbodiimida formando un anhídrido o anhídrido mixto -OCOAlq o -OCN(Alq1)NH(Alq2), en que Alq y Alq2, que pueden ser iguales o diferentes, son alquilo C₁-C₂₀, perfluoroalquilo C₁-C₂₀ o alcoxilo C₁-C₂₀; o ciclohexilo, 3-dimetilaminopropilo o *N*-morfolinoetilo).

** Las acilazidas también pueden trasponerse a isocianatos

La elección del grupo reactivo usado para fijar el tinte a una sustancia para conjugar depende típicamente del grupo funcional en la sustancia para conjugar y del tipo o longitud de ligamiento covalente deseado. Los tipos de grupos funcionales presentes típicamente en las sustancias orgánicas o inorgánicas incluyen, pero sin limitación, aminas, amidas, tioles, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, fosfatos, imidazoles, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas disustituidas, haluros, epóxidos, ésteres de carboxilato, ésteres de sulfonato, purinas, pirimidinas, ácidos carboxílicos, enlaces olefínicos o una combinación de estos grupos. Puede estar disponible un solo tipo de sitio reactivo en la sustancia (típico de polisacáridos) o puede aparecer una variedad de sitios (p.ej. aminas, tioles, alcoholes, fenoles), como es típico de proteínas. Una sustancia conjugada puede estar conjugada con más de un tinte, que puede ser el mismo o diferente, o con una sustancia que está adicionalmente modificada con un hapteno, tal como biotina.

Aunque puede obtenerse cierta selectividad mediante el control cuidadoso de las condiciones de reacción, la selectividad del marcaje se obtiene mejor mediante la selección de un tinte reactivo apropiado.

Típicamente, el grupo reactivo RG reaccionará con una amina, tiol, alcohol, aldehído o cetona. Preferiblemente, RG reacciona con un grupo funcional amina o tiol. En una realización, RG es un grupo acrilamida, amina reactiva (incluyendo cadaverina o etilendiamina), éster activado de un ácido carboxílico (típicamente éster de succinimidilo de un ácido carboxílico), acilazida, acilnitrilo, aldehído, haluro de alquilo, anhídrido, anilina, haluro de arilo, azida, aziridina, boronato, ácido carboxílico, diazoalcano, halogenoacetamida, halogenotriazina, hidrazina (incluyendo hidrazidas), imidoéster, isocianato, isotiocianato, maleimida, fosforamidita, complejo de platino reactivo, haluro de sulfonilo o tiol. Se entiende particularmente por "complejo de platino reactivo" complejos de platino químicamente reactivos tales como se describen en las patentes de EE.UU. n° 5.580.990, 5.714.327, 5.985.566.

Cuando RG es un éster activado de un ácido carboxílico, el tinte reactivo es particularmente útil para preparar conjugados de tinte de proteínas, nucleótidos, oligonucleótidos o haptenos. Cuando RG es una maleimida o halogenoacetamida, el tinte reactivo es particularmente útil para conjugación con sustancias que contienen tiol. Cuando RG es una hidrazida, el tinte reactivo es particularmente útil para conjugación con carbohidratos oxidados con peryodato y glicoproteínas y, además, es un trazador polar fijable por aldehído para microinyección celular. Preferiblemente, RG es ácido carboxílico, éster succinimidilo de ácido carboxílico, halogenoacetamida, hidrazina, isotiocianato, grupo maleimida, amina alifática, perfluorobenzamido, grupo azidoperfluorobenzamido o psoraleno. Más preferiblemente, RG es un éster de succinimidilo de ácido carboxílico, maleimida, yodoacetamida o un complejo de platino reactivo.

Como alternativa, el grupo reactivo RG es un grupo fotoactivable tal como un derivado de azida, diazirinilo, azidoarilo o psoraleno, en cuyo caso el tinte se vuelve químicamente reactivo solo después de iluminación con luz de una longitud de onda apropiada.

Síntesis de tintes reactivos

Las 7-hidroxycumarinas sustituidas con heterociclo hidrosolubles de la invención se preparan a partir de la condensación basada en anhídrido acético de 4-carbonilresorcinolales con un ácido acético heterocíclico o la condensación basada en base de 4-carbonilresorcinoles con compuestos de metileno activo. Estas estructuras básicas se sustituyen opcionalmente además durante o después de la síntesis, dando los correspondientes sustituyentes de tinte de cumarina, como se definen anteriormente. Se reconoce que hay muchas posibles variaciones que pueden procurar resultados equivalentes. Las síntesis típicas de los tintes de cumarina reactivos de la invención se ilustran en la Fig. 1. Podrían adaptarse otros métodos sintéticos de cumarinas conocidos en la bibliografía para preparar las cumarinas químicamente reactivas de la invención mediante ciertas modificaciones conocidas por los especialistas en la materia (véanse, por ejemplo, Bentsen *et al.*, patente de EE.UU. n° 6.566.508; Dittmer *et al.* 2005, *J. Org. Chem.* 70: 4682; Shi *et al.*, 2005, *Fen Xi Hua Xue* 33: 1452; Sivakumar *et al.*, 2004, *Org. Lett.* 6: 4603; Zhao *et al.*, 2004, *J. Am. Chem. Soc.* 126: 4653; Huang *et al.*, 1994, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1: 102 y Kuznetsova y Kaliya, 1992, *Russ. Chem. Rev.* 61: 1243.

Los métodos para la síntesis de tintes que contienen un grupo reactivo están bien documentados en la materia. Los tintes reactivos con amina, tales como "ésteres activados" de ácidos carboxílicos, se sintetizan típicamente acoplado un ácido carboxílico con un "grupo saliente" relativamente ácido. Otros grupos reactivos con amina preferidos incluyen haluros de sulfonilo, que se preparan a partir de ácidos sulfónicos usando un agente de halogenación tal como PCl₅ o POCl₃; halogenotriazinas, que se preparan mediante la reacción de haluros cianúricos con aminas e isocianatos o isotiocianatos, que se preparan a partir de aminas y fosgeno o tiofosgeno, respectivamente.

Los tintes que contienen aminas e hidrazidas, que son particularmente útiles para conjugación con ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas, se sintetizan lo más a menudo mediante la reacción de un éster activado de un ácido carboxílico o un haluro de sulfonilo con una diamina, tal como cadaverina, o con una hidrazina. Como alternativa, las aminas aromáticas se sintetizan comúnmente mediante la reducción química de un compuesto nitroaromático. Las aminas e hidrazinas son precursores particularmente útiles para la síntesis de halogenoacetamidas o maleimidas reactivas con tiol mediante métodos estándares.

Conjugados de tinte

Los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos de la invención pueden reaccionar con una amplia variedad de sustancias orgánicas o inorgánicas (a las que se hace referencia en la presente memoria como "sustratos") que contienen o se modifican para contener grupos funcionales con reactividad adecuada, dando como resultado la conjugación del tinte con la sustancia. Los conjugados de tinte útiles incluyen, entre otros, conjugados en que el sustrato es un aminoácido, nucleótido, biopolímero (p.ej. polímero aminoacídico, polímero de ácido nucleico, polisacárido, carbohidrato o lípido), un antígeno, esteroide, vitamina, fármaco, hapteno, metabolito, toxina, contaminante ambiental, resto complejante de iones o vidrio, plástico u otro polímero no biológico. En algunas realizaciones, el sustrato es una célula, sistema celular, fragmento o componente celular o partícula subcelular (p.ej., una partícula vírica, partícula bacteriana o componente de las mismas). Los tintes reactivos marcan típicamente grupos funcionales en la superficie celular, en membranas celulares, orgánulos o citoplasma.

Para uso en ensayos biológicos, el sustrato es típicamente un aminoácido, nucleótido o biopolímero, tal como un polímero aminoacídico, polímero de ácido nucleico, carbohidrato o polisacárido. Pueden prepararse conjugados de tinte-polímero que incorporan una pluralidad de moléculas de tinte conjugadas con el sustrato para aumentar la señal fluorescente del conjugado de tinte.

En una realización, el sustrato es un aminoácido o polímero aminoacídico tal como un péptido o proteína. Los ejemplos de polímeros aminoacídicos utilizables en la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos (como se definen ampliamente antes), proteínas de unión a IgG (p.ej., proteína A, proteína G, proteína A/G, etc.), enzimas, lectinas, glicoproteínas, histonas, albúminas, lipoproteínas, avidina, estreptavidina, proteína A, proteína G, fibiliproteínas y otras proteínas fluorescentes, hormonas, toxinas, quimiocinas, factores de crecimiento, neuropéptidos, citocinas, toxinas, sustratos de proteasa y sustratos de proteína cinasa. En una realización preferida, el sustrato biopolimérico es un anticuerpo monoclonal.

En otra realización, el sustrato es una base de ácido nucleico, nucleósido, nucleótido o polímero de ácido nucleico. Los polímeros de ácido nucleico incluyen aquellos que se modifican para poseer un ligador o espaciador adicional para la fijación de los tintes de la invención, tal como un ligamiento alquinilo (patente de EE.UU. nº 5.047.519), un ligamiento aminoalilo (patente de EE.UU. nº 4.711.955), un ligador sustituido con heteroátomo (patente de EE.UU. nº 5.684.142) u otro ligamiento. En otra realización, la sustancia conjugada es un análogo de nucleósido o nucleótido que liga una base de purina o pirimidina con un resto fosfato o polifosfato a través de un espaciador no cíclico. En otra realización, el tinte se conjuga con la porción de carbohidrato de un nucleótido o nucleósido, típicamente a través de un grupo hidroxilo pero como alternativa a través de un grupo tiol o amino (p.ej. como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.659.025, 5.668.268, 5.679.785). Típicamente, el nucleótido conjugado es un trifosfato de nucleósido o trifosfato de desoxinucleósido o trifosfato de didesoxinucleósido. La incorporación de restos de metileno o heteroátomos de nitrógeno o azufre al resto fosfato o polifosfato es también útil. Pueden acoplarse también con los tintes de la invención bases no purínicas y no pirimidínicas tales como 7-desazapurinas (patente de EE.UU. nº 6.150.510) y ácidos nucleicos que contienen dichas bases. Los aductos de ácido nucleico preparados mediante la reacción de ácidos nucleicos despurinados con derivados de amina, hidrazida o hidroxilamina proporcionan un medio adicional de marcaje y detección de ácidos nucleicos, p.ej. "A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair", Atamna *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 686-691.

Los conjugados de polímero de ácido nucleico preferidos son ADN o ARN marcados, monocatenarios o multicatenarios naturales o sintéticos, oligonucleótidos de ADN o ARN o híbridos de ADN/ARN, o incorporan un ligador inhabitual tal como fosfatos derivatizados de morfolina, o ácidos peptidonucleicos tales como unidades de *N*-(2-aminoetil)glicina. Cuando el ácido nucleico es un oligonucleótido sintético, contiene típicamente menos de 50 nucleótidos, más típicamente menos de 25 nucleótidos. Los conjugados de ácidos peptidonucleicos (APN) (Nielsen *et al.* patente de EE.UU. nº 5.539.082) pueden preferirse para algunas aplicaciones debido a sus velocidades de hibridación generalmente más rápidas.

En otra realización, el sustrato es un carbohidrato que es típicamente un polisacárido, tal como dextrano, heparina, glicógeno, amilopectina, manano, inulina, almidón, agarosa y celulosa. Como alternativa, el carbohidrato es un polisacárido que es un lipopolisacárido. Son conjugados de polisacárido preferidos dextrano o conjugados de lipopolisacárido.

En otra realización, el sustrato es un lípido (típicamente que tiene 6-60 carbonos), incluyendo glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Como alternativa, la sustancia conjugada es un conjunto de lípidos, tal como un liposoma. El resto lipófilo puede usarse para retener las sustancias conjugadas en las células, como se describe

en la patente de EE.UU. nº 5.208.148. Ciertos tintes polares de la invención pueden atraparse también en conjuntos lipídicos.

Los conjugados en que el sustrato es un resto complejante de iones sirven como indicadores para calcio, sodio, magnesio, cinc, potasio u otros iones metálicos biológicamente importantes. Son restos complejantes de iones preferidos los éteres corona (patente de EE.UU. nº 5.405.975); derivados de ácido 1,2-bis-(2-aminofenoxietano)-*N,N,N',N'*-tetraacético (quelantes de BAPTA; patentes de EE.UU. nº 5.453.517, 5.516.911 y 5.049.673); derivados de ácido 2-carboximetoxianilino-*N,N*-diacético (quelantes de APTRA; Am. J. Physiol. 256, C540 (1989)); o quelantes de iones metálicos basados en piridina y fenantrolina (patente de EE.UU. nº 5.648.270); o derivados de ácido nitrilotriacético, véase p.ej. "Single-step synthesis and characterization of biotinylated nitrilotriacetic acid, a unique reagent for the detection of histidine-tagged proteins immobilized on nitrocellulose", McMahan *et al.*, 1996, Anal. Biochem. 236: 101-106. Preferiblemente, el resto complejante de iones es un quelante de éter corona, quelante de BAPTA, quelante de APTRA o derivado de ácido nitrilotriacético.

Otros conjugados de materiales no biológicos incluyen conjugados de tinte de polímeros orgánicos o inorgánicos, películas poliméricas, obleas poliméricas, membranas poliméricas, partículas poliméricas o micropartículas poliméricas, incluyendo microesferas magnéticas y no magnéticas; partículas de hierro, oro o plata, metales y no metales conductores y no conductores y superficies y partículas de vidrio y plástico. Los conjugados se preparan opcionalmente mediante la copolimerización de un tinte que contiene una funcionalidad apropiada mientras se prepara el polímero, o mediante la modificación química de un polímero que contiene grupos funcionales con una reactividad química adecuada. Otros tipos de reacciones que son útiles para preparar conjugados de tintes de polímeros incluyen polimerizaciones o copolimerizaciones catalizadas de alquenos y reacciones de dienos con dienófilos, transesterificaciones o transaminaciones.

En algunas realizaciones, los conjugados de tinte se marcan adicionalmente con al menos un segundo tinte luminiscente, que es opcionalmente un tinte adicional de la presente invención, formando un par de transferencia de energía. En algunos aspectos de la invención, el conjugado marcado funciona como sustrato enzimático, y la hidrólisis enzimática perturba la transferencia de energía.

Los conjugados de tinte fluorescente, particularmente en los que el sustrato es un biopolímero, pueden incorporar múltiples tintes por molécula de sustrato para aumentar la señal fluorescente. Preferiblemente, se incorporan al menos 3 moléculas de tintes a los conjugados de tinte-biopolímero. En realizaciones en que el biopolímero es un anticuerpo, se conjugan al menos 3, más preferiblemente al menos 6 moléculas de tinte con el anticuerpo. En algunas realizaciones, pueden conjugarse del orden de aproximadamente 35 moléculas con el anticuerpo sin un autoapagamiento significativo, pero más típicamente del orden de aproximadamente 15-20. Se entenderá por un especialista en la materia que se pretende que cada intervalo indicado de tintes por sustrato de conjugado describa todos los valores dentro del intervalo. Por tanto, por ejemplo, al afirmar que los biopolímeros fluorescentes de la invención contienen 6-15 moléculas de tinte, los biopolímeros que contienen 6, 7, 8, ..., o 15 moléculas de tinte son también parte de la invención.

Preparación de conjugados de tinte

Los conjugados de tinte de la presente invención se sintetizan típicamente como el producto de una reacción entre un sustrato y un tinte de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosoluble reactivo. La preparación de conjugados de tinte usando tintes reactivos está bien documentada, p.ej., Hermanson, 1996, "Bioconjugate Techniques" (Academic Press, Nueva York, NY); Haugland, 1995, Methods Mol Biol. 45: 205-21 y Brinkley, 1992, "Bioconjugate Chemistry" 3:2. Los conjugados son típicamente el resultado de mezclar tintes reactivos apropiados y la sustancia para conjugar en un disolvente adecuado en que ambos sean solubles. Las disoluciones acuosas de los tintes de 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosolubles reactivos descritos en la presente memoria se crean fácilmente, facilitando reacciones de conjugación con la mayoría de materiales biológicos. Para aquellos tintes reactivos que se fotoactivan, la conjugación requiere iluminación de la mezcla de reacción para activar el tinte reactivo.

Los biopolímeros fluorescentes de la presente invención se sintetizan típicamente como el producto de reacción entre un biopolímero y una 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosoluble reactiva, en el que las condiciones de reacción dan como resultado la conjugación de múltiples moléculas de tinte con cada biopolímero. Como alternativa, el biopolímero fluorescente puede sintetizarse como una reacción de polimerización de moléculas de subunidades, en la que se han conjugado una o más de las moléculas de subunidades con una 7-hidroxycumarina sustituida con heterociclo hidrosoluble reactiva antes de la polimerización del biopolímero. Es un ejemplo de este último método la síntesis de oligonucleótidos usando la química de fosforamida estándar, en que se marca con tinte al menos una fosforamida.

Aplicaciones y métodos de uso

En un aspecto de la invención, se usan los tintes reactivos de la invención para teñir o marcar directamente una muestra, o componentes de la muestra, de modo que la muestra pueda identificarse o cuantificarse. Los compuestos

de tinte químicamente reactivos se fijarán covalentemente con el correspondiente grupo funcional en una amplia variedad de materiales, formando conjugados de tinte como se describen anteriormente.

5 En realizaciones preferidas, los compuestos de tinte reactivos de la invención se usan para teñir o marcar directamente muestras con componentes biológicos. La muestra puede comprender mezclas heterogéneas de componentes (incluyendo células intactas, extractos de células, bacterias, virus, orgánulos y mezclas de los mismos) o un solo componente o grupo homogéneo de componentes (p.ej. polímeros de aminoácidos naturales o sintéticos, ácidos nucleicos o carbohidratos, o complejos de membrana lipídica). Estos tintes son generalmente no tóxicos para las células vivas y otros componentes biológicos, dentro de las concentraciones típicas de uso.

10 Para tinción directa, se combina el compuesto de tinte con la muestra de cualquier modo que facilite el contacto entre el componente de tinte y los componentes de interés de la muestra. Típicamente, el compuesto de tinte o solución que contiene el compuesto de tinte se añade simplemente a la muestra. Ciertos tintes de la invención, particularmente aquellos que están sustituidos con uno o más restos de ácido sulfónico, tienden a ser no permeantes por membranas de células biológicas, y una vez dentro de células viables, se retienen típicamente bien. Pueden usarse tratamientos que permeabilizan la membrana plasmática, tales como electroporación, tratamientos de choque y ATP extracelular alto, para introducir compuestos de tinte seleccionados en las células. Como alternativa, los compuestos de tinte seleccionados pueden insertarse físicamente en células, p.ej. mediante métodos de microinyección a presión, carga por raspado, fijación de membranas o fagocitosis.

20 Los tintes que incorporan un residuo de amina alifática o hidrazina pueden microinyectarse en células, donde pueden fijarse en su lugar por fijadores aldehídicos tales como formaldehído o glutaraldehído. Esta capacidad de fijación hace a dichos tintes útiles para aplicaciones intracelulares tales como rastreo neuronal.

Los compuestos de tinte que poseen un sustituyente lipófilo, tal como fosfolípidos, se incorporarán no covalentemente a conjuntos lipídicos, p.ej. para uso como sondas para estructura de membrana; o para incorporación a liposomas, lipoproteínas, películas, plásticos, microesferas lipófilas o materiales similares; o para rastreo. Los tintes lipófilos son útiles como sondas fluorescentes de la estructura de membrana.

25 Para la tinción directa de analitos en aplicaciones biológicas, los compuestos de tinte de la invención se usan típicamente en una disolución acuosa, mayoritariamente acuosa o miscible con agua, preparada según métodos generalmente conocidos en la materia. La concentración exacta de compuesto de tinte depende de las condiciones experimentales y los resultados deseados, pero típicamente oscila de aproximadamente 1 nM a 1 mM o más. La concentración óptima se determina por variación sistemática hasta lograr resultados satisfactorios con una fluorescencia de fondo mínima.

30 En otro aspecto de la invención, los conjugados de tinte fluorescente de la presente invención son útiles como reactivos de detección, o como parte de ellos, típicamente reactivos de detección específicos de analito, para facilitar la detección óptica y análisis de analitos. En una realización, el sustrato de conjugado de tinte mismo es un reactivo específico de analito, y el conjugado de tinte fluorescente se usa como reactivo de detección para marcar un analito de interés. En una realización alternativa, el conjugado de tinte fluorescente se une a un reactivo específico de analito, y se usa la entidad combinada como reactivo de detección para marcar un analito de interés. En esta realización alternativa, el conjugado de tinte actúa como marcaje fluorescente unido al reactivo específico de analito.

40 Los ensayos en que uno o más analitos de interés se marcan usando reactivos de detección específicos de analito y posteriormente se analizan ópticamente son bien conocidos en la materia, y los presentes conjugados de tinte fluorescente son generalmente útiles como reactivos de detección en dichos ensayos. Por ejemplo, las proteínas en una muestra pueden marcarse usando un reactivo de detección consistente en una proteína marcada, típicamente un anticuerpo que se une específicamente a la proteína analito. La detección de las proteínas analitos marcadas resultantes puede llevarse a cabo usando una serie de formatos e instrumentaciones de ensayo bien conocidos, incluyendo el uso de citometría de flujo, citometría de barrido, imagenología y análisis en gel. La citometría de flujo se describe detalladamente en la amplia bibliografía en este campo incluyendo, por ejemplo, Landy *et al.* (eds.), "Clinical Flow Cytometry", *Annals of the New York Academy of Sciences*, volumen 677 (1993); Bauer *et al.* (eds.), "Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications", Williams & Wilkins (1993); Ormerod (ed.), "Flow Cytometry: A Practical Approach", Oxford Univ. Press (1997); Jaroszeski *et al.* (eds.), "Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology" n° 91, Humana Press (1997) y Practical Shapiro, "Flow Cytometry", 4ª ed., Wiley-Liss (2003). La microscopía de imagenología por fluorescencia se describe, por ejemplo, en Pawley (ed), "Handbook of Biological Confocal Microscopy", 2ª edición, Plenum Press (1989).

55 Las fuentes de iluminación útiles para excitar los polímeros fluorescentes de la invención incluyen, pero sin limitación, lámparas ultravioletas manuales, lámparas de arco de mercurio, lámparas de xenón, láseres y diodos láser. Estas fuentes de iluminación están opcionalmente integradas en escáneres láser, lectores de microplaca de fluorescencia, fluorómetros estándares o minifluorómetros o detectores cromatográficos. Los polímeros fluorescentes preferidos de la invención son excitables a o cerca de 405 nm, y pueden excitarse usando una fuente de excitación láser violeta relativamente económica.

Kits

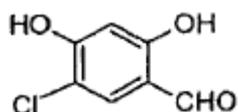
Es un aspecto de la presente invención la formulación de kits que facilitan la práctica de diversos ensayos que usan cualquiera de los tintes de la invención, como se describe anteriormente. Los kits de la invención comprenden típicamente un tinte coloreado o fluorescente de la invención, presente como un marcador químicamente reactivo útil para preparar conjugados de tinte o presente como un conjugado de tinte en que la sustancia conjugada es un miembro de un par de unión específico, o un nucleósido, nucleótido, oligonucleótido, polímero de ácido nucleico, péptido o proteína. Opcionalmente, los kits comprenden adicionalmente además uno o más agentes de tamponación típicamente presentes como una disolución acuosa. Opcionalmente, los kits de la invención comprenden adicionalmente reactivos de detección adicionales, un medio de purificación para purificar la sustancia marcada resultante, patrones de luminiscencia, enzimas, inhibidores enzimáticos, disolvente orgánico o instrucciones para llevar a cabo un ensayo de la invención.

Ejemplos

Se proporcionan en los ejemplos siguientes ejemplos de las estrategias de síntesis de tintes seleccionados, la síntesis de biopolímeros fluorescentes seleccionados, su caracterización y métodos de uso.

15 Ejemplo 1

Preparación del compuesto 1

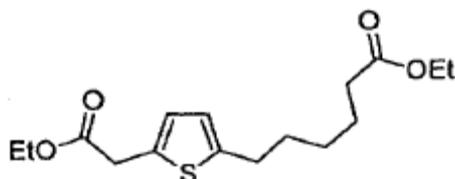


Compuesto 1

Se disuelve 4-clororesorcinol (50 g) en éter seco (200 ml). Se añaden a la disolución cianuro de cinc en polvo fino (60 g) y cloruro de potasio (12 g) con agitación. Se enfría la suspensión a 0 °C. Se sopla una fuerte corriente de cloruro de hidrógeno gaseoso en la disolución con agitación vigorosa. Después de aproximadamente 30-60 minutos, se disuelven los reactantes. Se continúa la adición de cloruro de hidrógeno gaseoso hasta que dejar de absorberse en la disolución de éter. Se agita la suspensión durante 1 hora adicional en hielo. Se vierte la disolución de éter desde el sólido, que se trata con hielo y se calienta a 100 °C en un baño de hielo. Tras enfriar, el producto cristalizó en placas brillantes de la disolución, que se retiran por filtración y se secan al aire dando el aldehído deseado.

25 Ejemplo 2

Preparación del compuesto 2

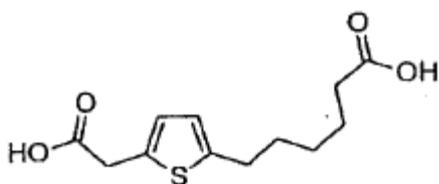


Compuesto 2

Se disuelven 2-tiofenoacetato de etilo (10 g) y 6-bromohexanoato de etilo (12 g) en diclorometano (200 ml). Se añade a la disolución AlCl_3 anhidro (24 g) bajo protección de nitrógeno seco con agitación vigorosa a 0 °C. Se agita la mezcla de reacción bajo protección de nitrógeno seco a 0 °C y se calienta a temperatura ambiente cuando la reacción se ha completado como se indica por TLC. Se vierte la mezcla de reacción en agua con hielo y se extrae con cloroformo (3x200 ml). Se combinan las fases de cloroformo, se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y se retira el disolvente a vacío, dando un sólido bruto. Se purifica adicionalmente el sólido bruto en una columna de gel de sílice con un gradiente de cloroformo/acetato de etilo como eluyente, procurando el compuesto 2 deseado.

35 Ejemplo 3

Preparación del compuesto 3

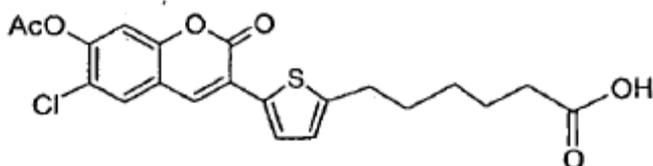


Compuesto 3

Se disuelve el compuesto 2 (10 g) en etanol (100 ml). Se añade a la solución NaOH 5 M (65 ml). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se neutraliza con HCl concentrado cuando la reacción se ha completado como se indica por TLC. Se extrae la mezcla resultante con acetato de etilo (3x200 ml). Se combinan las fases de acetato de etilo, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se retira el disolvente a vacío, dando el compuesto 3 deseado.

5 Ejemplo 4

Preparación del compuesto 4

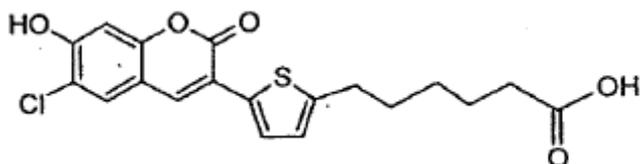


Compuesto 4

10 Se suspenden el compuesto 1 (6 g) y el compuesto 3 (5,8 g) en anhídrido acético (100 ml). Se añade a la suspensión trietilamina (6 ml) a temperatura ambiente. Se calienta la mezcla de reacción a 120-140°C hasta completar la reacción como se indica por TLC. Después de enfriar a temperatura ambiente, se vierte la mezcla en agua con hielo y se filtra el precipitado resultante con succión recogiendo el sólido, que se seca al aire. Se recristaliza el producto bruto, procurando el compuesto 4 deseado.

Ejemplo 5

Preparación del compuesto 5



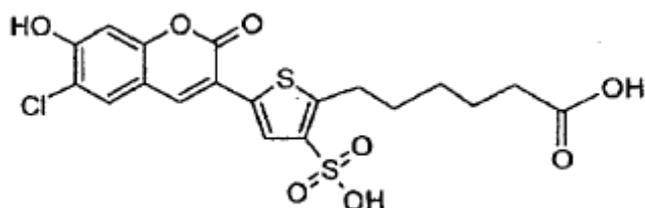
15

Compuesto 5

20 Se suspende el compuesto 4 (5 g) en HCl al 20 % (300 ml). Se calienta la mezcla de reacción a 60-70 °C hasta completar la reacción como se indica por TLC. Se diluye la mezcla de reacción con agua (200 ml) y se extrae con acetato de etilo (3x300 ml). Se combinan las fases de acetato de etilo, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se retira el disolvente a vacío, dando el compuesto 5 bruto. Se purifica adicionalmente el material bruto en una columna de gel de sílice con un gradiente de cloroformo/etanol como eluyente, procurando el compuesto 5 deseado.

Ejemplo 6

Preparación del compuesto 6

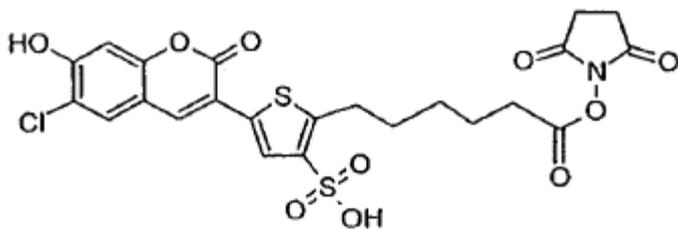


Compuesto 6

25 Se suspende el compuesto 5 (1 g) en H₂SO₄ concentrado (5 ml). Se añade a la suspensión H₂SO₄ fumante al 20 % (5 ml). Se agita la mezcla de reacción a 0 °C hasta completar la reacción como se indica por TLC. Se añade gota a gota la mezcla de reacción a éter frío (200 ml) con agitación vigorosa, dando el compuesto 6 bruto en forma de un precipitado amarillo. Se purifica adicionalmente el material bruto por HPLC preparativa, procurando el compuesto 6 deseado usando TFA al 0,1 % en agua-TFA al 0,1 % en un sistema de tampón de MeCN.

Ejemplo 7

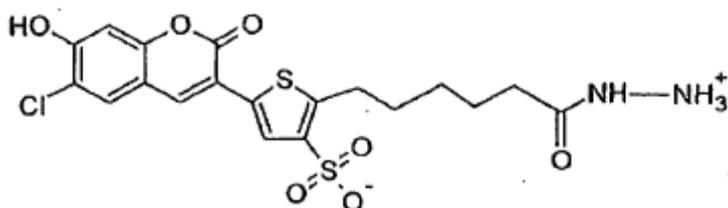
Preparación del compuesto 7

**Compuesto 7**

- 5 Se disuelven el compuesto 6 (100 mg) y carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (85 mg) en DMF (5 ml). Se añaden a la disolución 4-dimetilaminopiridina (5 mg) y trietilamina anhidra (0,1 ml) bajo protección de nitrógeno seco con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Se agita la mezcla de reacción bajo protección con nitrógeno seco a temperatura ambiente hasta completar la reacción como se indica por TLC. Se vierte la mezcla de reacción en éter y se recoge el precipitado resultante por filtración. Se lava el sólido con éter, procurando el compuesto 7 deseado.

Ejemplo 8

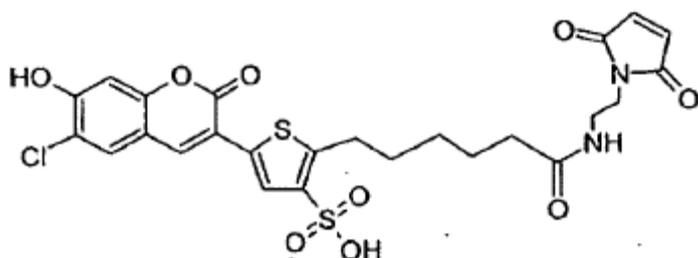
10 Preparación del compuesto 8

**Compuesto 8**

- 15 Se añade el compuesto 7 (100 mg) en DMF (0,5 ml) a hidrazina anhidra (100 µl) en DMF (0,5 ml). Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se vierte la disolución de reacción en agua y se centrifuga el precipitado resultante recogiendo el sólido, que se lava con agua y se seca al aire. Se purifica adicionalmente el producto bruto por HPLC.

Ejemplo 9

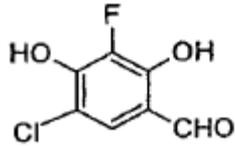
Preparación del compuesto 9

**Compuesto 9**

- 20 Se añaden 4 equivalentes de trietilamina y 1,2 equivalentes de sal del ácido trifluoroacético de *N*-(2-aminoetil)maleimida (Sigma-Aldrich) al compuesto 7 (10 mg) en DMF (0,2 ml) a temperatura ambiente. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se vierte la disolución de DMF en agua y se centrifuga la suspensión resultante recogiendo el sólido, que se seca al aire. Se purifica adicionalmente el producto bruto por cromatografía de gel de sílice, procurando el compuesto 9 deseado.

Ejemplo 10

Preparación del compuesto 10

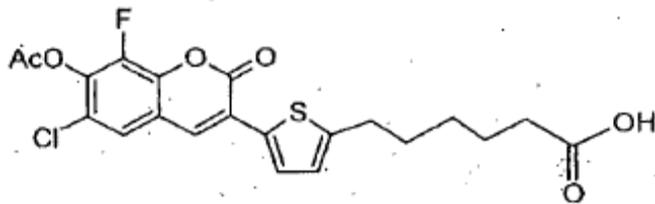


Compuesto 10

5 Se prepara el compuesto 10 a partir de 4-cloro-2-fluororesorcinol (Fanbo Biochemicals, Ltd., Pekín, China) análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 1.

Ejemplo 11

Preparación del compuesto 11

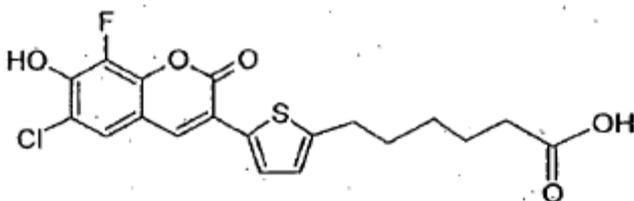


Compuesto 11

10 Se prepara el compuesto 11 a partir de la condensación del compuesto 10 con el compuesto 3 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 4.

Ejemplo 12

Preparación del compuesto 12

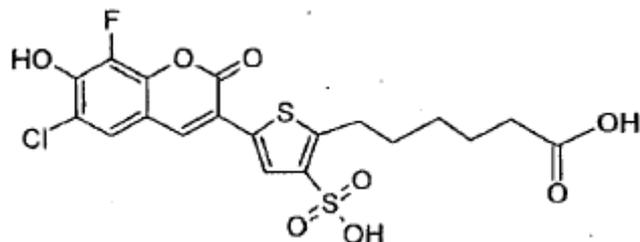


Compuesto 12

15 Se prepara el compuesto 12 por la hidrólisis ácida del compuesto 11 con HCl al 20 % análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 5.

Ejemplo 13

Preparación del compuesto 13

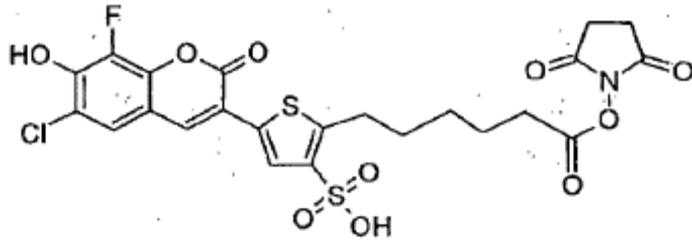


Compuesto 13

20 Se prepara el compuesto 13 por la sulfonación del compuesto 12 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 6.

Ejemplo 14

Preparación del compuesto 14

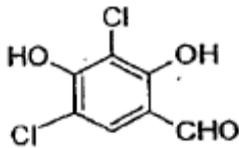


Compuesto 14

5 Se prepara el compuesto 14 por la condensación del compuesto 13 con carbonato de *N,N*-disuccinimidilo análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 7.

Ejemplo 15

Preparación del compuesto 15

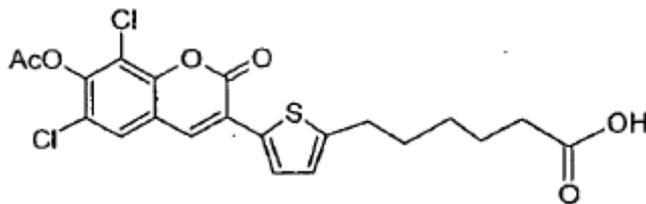


Compuesto 15

10 Se prepara el compuesto 15 a partir de 2,4-diclororresorinol (Fanbo Biochemicals, Ltd.) análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 1.

Ejemplo 16

Preparación del compuesto 16

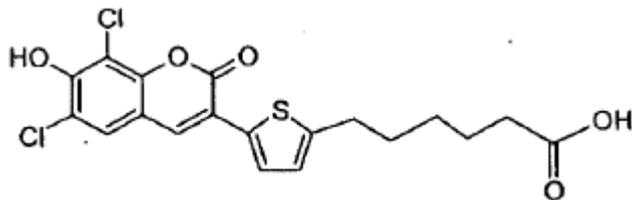


Compuesto 16

15 Se prepara el compuesto 16 por la condensación del compuesto 15 con el compuesto 3 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 4.

Ejemplo 17

Preparación del compuesto 17

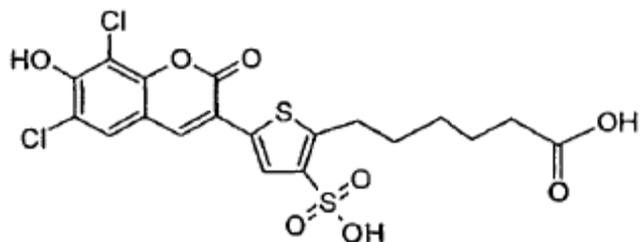


Compuesto 17

20 Se prepara el compuesto 17 por la hidrólisis ácida del compuesto 16 con HCl al 20 % análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 5.

Ejemplo 18

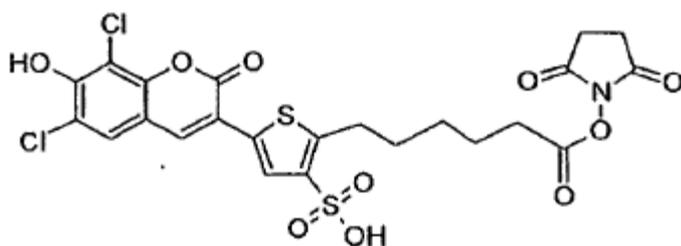
Preparación del compuesto 18

**Compuesto 18**

- 5 Se prepara el compuesto 18 por sulfonación del compuesto 17 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 6.

Ejemplo 19

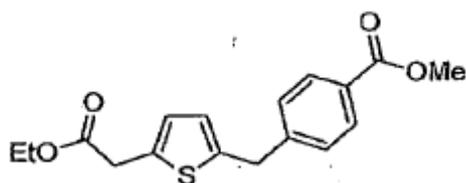
Preparación del compuesto 19

**Compuesto 19**

- 10 Se prepara el compuesto 19 por condensación del compuesto 18 con carbonato de *N,N*-disuccinimidilo análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 7.

Ejemplo 20

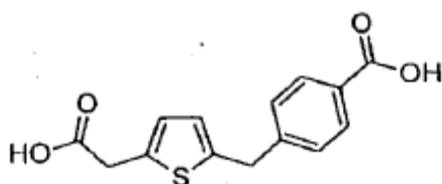
Preparación del compuesto 20

**Compuesto 20**

- 15 Se disuelven 2-tiENOacetato de etilo (5 g) y 4-bromometilbenzoato de metilo (6,2 g) en diclorometano (200 ml). Se añade a la disolución AlCl_3 anhidro (12 g) bajo protección de nitrógeno seco con agitación vigorosa a 0 °C. Se agita la mezcla de reacción bajo protección de nitrógeno a 0 °C y se calienta a temperatura ambiente cuando se completa la reacción, como se indica por TLC. Se vierte la mezcla de reacción en agua con hielo y se extrae con cloroformo (3x200 ml). Se combinan las fases de cloroformo, se secan sobre Na_2SO_4 anhidro y se retira el disolvente a vacío, dando un sólido bruto. Se purifica adicionalmente el sólido bruto en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente, procurando el compuesto 20 deseado.
- 20

Ejemplo 21

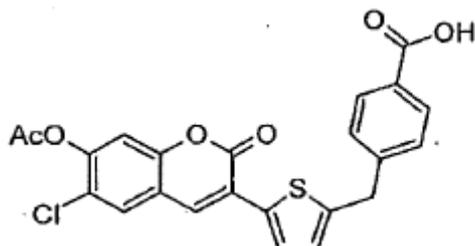
Preparación del compuesto 21

**Compuesto 21**

Se disuelve el compuesto 20 (5 g) en etanol (50 ml). Se añade a la disolución NaOH 5 M (65 ml). Se agita la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se neutraliza con HCl concentrado cuando se completa la reacción como se indica por TLC. Se extrae la mezcla de reacción con acetato de etilo (3x200 ml). Se combinan las fases de acetato de etilo, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se retira el disolvente a vacío, dando el compuesto 21 deseado.

5 Ejemplo 22

Preparación del compuesto 22

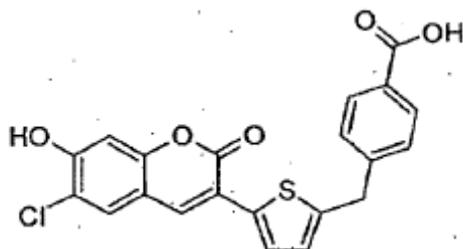


Compuesto 22

Se prepara el compuesto 22 por la condensación del compuesto 21 con el compuesto 1 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 4.

10 Ejemplo 23

Preparación del compuesto 23

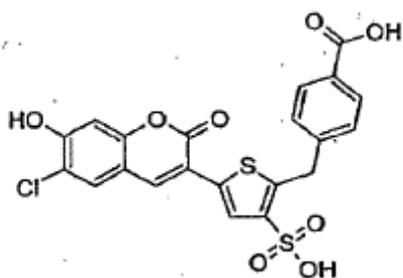


Compuesto 23

Se prepara el compuesto 23 por la hidrólisis ácida del compuesto 22 con HCl al 20 % análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 5.

15 Ejemplo 24.

Preparación del compuesto 24

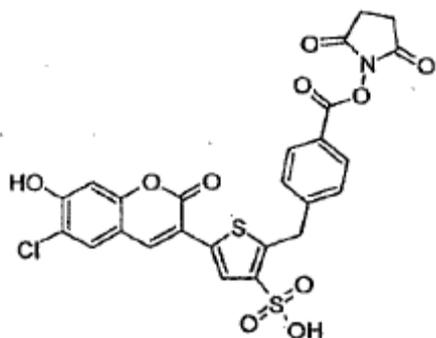


Compuesto 24

Se prepara el compuesto 24 por LA sulfonación del compuesto 23 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 6.

Ejemplo 25

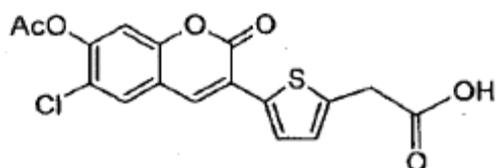
Preparación del compuesto 25

**Compuesto 25**

- 5 Se prepara el compuesto 25 por LA condensación del compuesto 24 con carbonato de *N,N*-disuccinimidilo análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 7.

Ejemplo 26

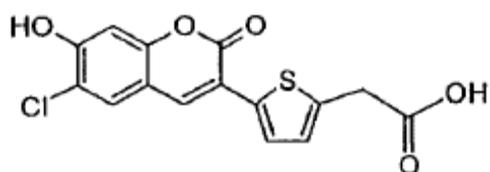
Preparación del compuesto 26

**Compuesto 26**

- 10 Se suspenden el compuesto 1 (1 g) y 2,5-dicarboximetiltiofeno (6 g, Sigma-Aldrich) en anhídrido acético (100 ml). Se añade a la suspensión trietilamina (6 ml) a temperatura ambiente. Se calienta la mezcla de reacción resultante a 120-140 °C hasta completar la reacción como se indica por TLC. Después de enfriar a temperatura ambiente, se vierte la mezcla en agua con hielo y se filtra el precipitado resultante con succión recogiendo el sólido, que se seca al aire. Se purifica adicionalmente el sólido bruto en una columna de gel de sílice con un gradiente de cloroformo/metanol como eluyente, procurando el compuesto 26 deseado.

15 Ejemplo 27

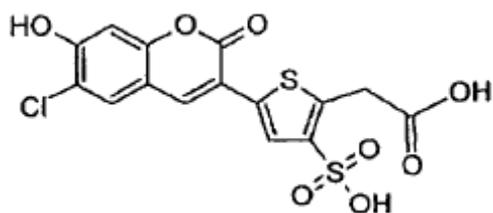
Preparación del compuesto 27

**Compuesto 27**

- Se prepara el compuesto 27 por la hidrólisis ácida del compuesto 26 con HCl al 20 % análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 5.

20 Ejemplo 28

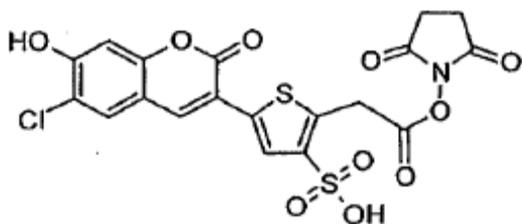
Preparación del compuesto 28

**Compuesto 28**

Se prepara el compuesto 28 por la sulfonación del compuesto 27 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 6.

Ejemplo 29

Preparación del compuesto 29

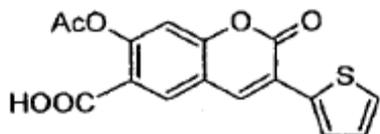


Compuesto 29

Se prepara el compuesto 29 por la condensación del compuesto 24 con carbonato de *N,N*-disuccinimidilo análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 7.

Ejemplo 30

Preparación del compuesto 30

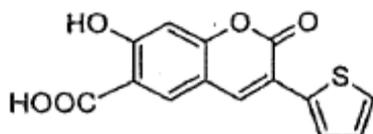


Compuesto 30

Se prepara el compuesto 30 por la condensación de ácido 2,4-dihidroxi-5-formilbenzoico (Fanbo Biochemicals, Ltd.) con ácido 2-tienoacético análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 4.

Ejemplo 31

Preparación del compuesto 31

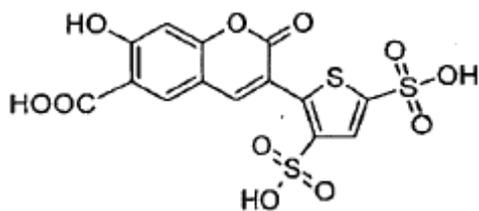


Compuesto 31

Se prepara el compuesto 31 por la hidrólisis ácida del compuesto 30 con HCl al 20 % análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 5.

Ejemplo 32

Preparación del compuesto 32

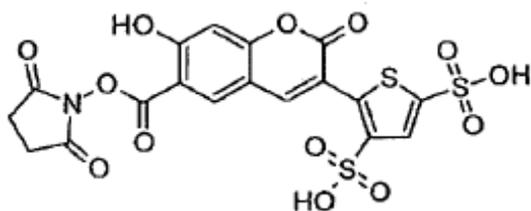


Compuesto 32

Se prepara el compuesto 32 por la sulfonación del compuesto 31 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 6.

Ejemplo 33

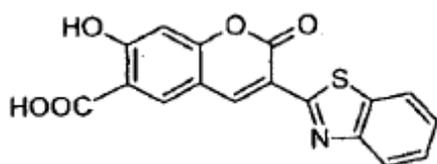
Preparación del compuesto 33

**Compuesto 33**

- 5 Se prepara el compuesto 33 por la condensación del compuesto 32 con carbonato de *N,N*-disuccinimidilo análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 7.

Ejemplo de referencia 34

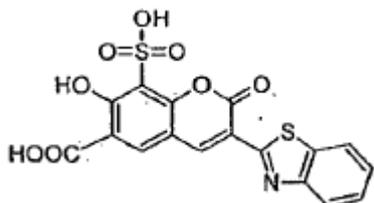
Preparación del compuesto 34

**Compuesto 34**

- 10 Se calientan 2-benzotiazolacetato de etilo (5 g, Sigma-Aldrich), ácido 2,4-dihidroxi-5-formilbenzoico (2 g, Fanbo Biochemicals, Ltd.), 0,5 ml de piperidina y 0,3 ml de ácido acético a reflujo en 100 ml de metanol hasta que se completa la reacción como se indica por TLC. Después de enfriar a temperatura ambiente, se filtra la mezcla y se concentra el filtrado. Se vierte el concentrado filtrado en agua y se filtra el precipitado resultante con succión recogiendo el sólido, que se seca al aire. Se purifica adicionalmente el producto bruto con cromatografía en gel de sílice procurando el compuesto 34 deseado.

15 Ejemplo de referencia 35

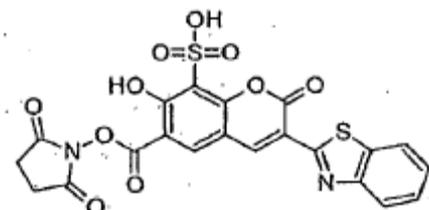
Preparación del compuesto 35

**Compuesto 35**

- Se prepara el compuesto 35 por la sulfonación del compuesto 34 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 6.

20 Ejemplo de referencia 36

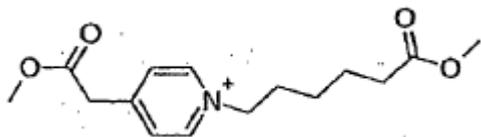
Preparación del compuesto 36

**Compuesto 36**

- Se prepara el compuesto 36 por la condensación del compuesto 35 con carbonato de *N,N*-disuccinimidilo análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 7.

Ejemplo de referencia 37

Preparación del compuesto 37

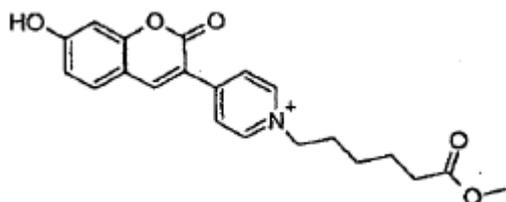


Compuesto 37

5 Se calientan metil-4-carboximetilpiridina (5 g) y 6-bromohexanoato de metilo (8 g) en 1,2-diclorobenceno (50 ml) hasta que la reacción se completa como se indica por TLC. Después de enfriar a temperatura ambiente, se filtra la mezcla recogiendo el sólido, que se lava con éter y se seca al aire. Se usa directamente el producto bruto para la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

Ejemplo de referencia 38

Preparación del compuesto 38



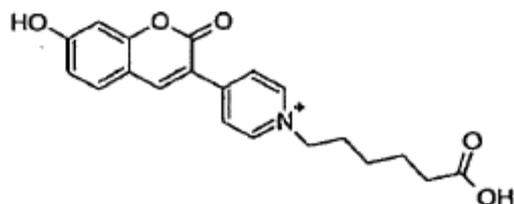
10

Compuesto 38

Se prepara el compuesto 38 por la condensación catalizada por piperidina del compuesto 37 con resorcinol análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 34.

Ejemplo de referencia 39

Preparación del compuesto 39



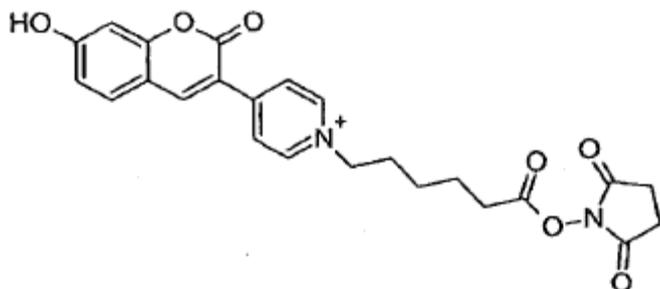
15

Compuesto 39

Se prepara el compuesto 39 por la hidrólisis del compuesto 38 análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 5.

Ejemplo de referencia 40

Preparación del compuesto 40



20

Compuesto 40

Se prepara el compuesto 40 por la condensación del compuesto 39 con carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo análogamente al procedimiento para preparar el compuesto 7.

Ejemplo 41

Preparación de conjugados de proteína-tinte

5 Pueden prepararse conjugados de proteína-tinte por medios estándares tales como aquellos descritos, por ejemplo, en Haugland *et al.* 1995, Meth. Mol. Biol. 45: 205; Haugland, 1995, Meth. Mol. Biol. 45: 223; Haugland, 1995, Meth. Mol. Biol. 45: 235; Haugland, 2000, Current Protocols In Cell Biology 16.5.1-16.5.22. Por ejemplo, pueden prepararse conjugados de proteína-tinte usando un éster de succinimidilo de la invención como sigue.

10 Se prepara una disolución de la proteína a aproximadamente 10 mg/ml en bicarbonato de sodio 0,1 M. Se disuelven los reactivos de marcaje en un disolvente adecuado tal como agua o DMF o DMSO a aproximadamente 10 mg/ml. Se añaden cantidades predeterminadas de los reactivos de marcaje a las disoluciones de proteína con agitación. Se incuba la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora o en hielo durante varias horas. Se separa típicamente el conjugado de tinte-proteína del reactivo no reaccionado libre por cromatografía de exclusión por tamaño, tal como en resina Amersham PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) equilibrada con disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se recoge la banda coloreada que contiene proteína inicial y se determina el grado de sustitución a partir de la absorbancia al máximo de absorbancia de cada fluoróforo, usando el coeficiente de extinción del fluoróforo libre. El conjugado de tinte-proteína así obtenido puede subfraccionarse procurando conjugados con GDS mayor, menor o más uniforme.

15 Para muchas aplicaciones, tales como para producir anticuerpos marcados con tinte, se usa un cociente molar de 10 a 50 equivalentes de tinte por equivalente de proteína. Se entenderá que las condiciones de reacción y concentraciones de reactante óptimas se determinan empíricamente. La optimización de conjugación de tinte-proteína es bien conocida en la materia y se describe, por ejemplo, en las referencias citadas en la presente memoria.

Ejemplo 42

Preparación de conjugados de anticuerpo-tinte

25 Se describe a continuación un protocolo preferido para preparar conjugados de tinte de un anticuerpo monoclonal de IgG. Se prepararon los conjugados de tinte de los compuestos 7, 13, 14, 19, 25 y 60 usando esencialmente el mismo protocolo, con variaciones menores, al observado a continuación.

Etapa 1. Preparar la disolución de anticuerpo: Se prepara una disolución del anticuerpo en tampón de marcaje (NaPi 0,05 M, pH 8,0 + NaCl 0,15 M + 20 % de glicerol) a una concentración de aproximadamente 2-20 mg/ml.

30 La concentración del anticuerpo en disolución puede calcularse a partir de la ley de Lambert-Beer, $A_{280} = \epsilon_P \cdot C \cdot L$, en que A_{280} es la absorbancia medida a 280 nm (que es la longitud de onda de absorción máxima de proteína), ϵ_P es el coeficiente de extinción molar de la proteína de anticuerpo, C es la concentración y L es la longitud del recorrido de la luz a través de la disolución. Un anticuerpo de IgG típico tiene un valor de ϵ_P de $224.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

35 *Etapa 2. Preparar la disolución de tinte:* Se prepara una disolución de tinte disolviendo el tinte en DMSO. Se determina la concentración de tinte como se describe a continuación. La exactitud de la medida de la concentración de tinte puede mejorarse diluyendo en primer lugar el tinte 1/100 en glicina 1 M, pH 9,6.

40 Puede calcularse la concentración de tinte en disolución a partir de la ley de Lambert-Beer: $A_{\text{máx}} = \epsilon_{\text{tinte}} \cdot C \cdot L$, en que $A_{\text{máx}}$ es la absorbancia medida a la longitud de onda de absorción máxima del tinte, ϵ_{tinte} es el coeficiente de extinción molar del tinte, C es la concentración y L es la longitud del recorrido de la luz a través de la disolución. Como ejemplo, la longitud de onda de absorción máxima del compuesto 7 amida es de aproximadamente 415 nm. Para otros compuestos de tinte, la longitud de onda de absorción máxima del tinte reactivo debería medirse antes de la conjugación.

45 *Etapa 3. Llevar a cabo la reacción de conjugación:* Se calculan las cantidades de anticuerpo y disoluciones de tinte para obtener el exceso molar deseado de tinte en la reacción. Para estudios de optimización, se llevan a cabo reacciones usando un intervalo de exceso molar de tinte típicamente entre 2x y 60x exceso molar de tinte. Se añade la disolución de anticuerpo a la disolución de tinte con agitación eficaz o sacudidas y se mantiene la mezcla de reacción agitada o sacudida durante 1-2 horas para obtener el conjugado de anticuerpo-tinte.

50 *Etapa 4. Purificar el conjugado:* El conjugado de anticuerpo-tinte puede purificarse usando una columna Bio-Spin. Se cargan 50 μl de disolución de conjugado de anticuerpo-tinte y 50 μl de un tampón de detección (PBS + 20 % de glicerol + 0,1 % de NaN_3) en una columna Bio-Spin, se dispone 1 ml del tampón de detección en el tubo receptor de la columna de centrifugación y se separa. Se somete a vórtex después de la separación.

Como alternativa, el conjugado de anticuerpo-tinte puede purificarse usando una columna PD-10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), siguiendo el protocolo del fabricante.

Etapa 5. Determinar el grado de sustitución del conjugado de anticuerpo-tinte: Se calcula el grado de sustitución (GDS) usando la siguiente ecuación:

$$\text{GDS} = [\text{tinte}]/[\text{anticuerpo}] = A_{\text{máx}} \cdot \epsilon_P / (\epsilon_{\text{tinte}} \cdot (A_{280} \cdot 0,55 \cdot A_{\text{máx}})),$$

5 en que [tinte] es la concentración de tinte, [anticuerpo] es la concentración de anticuerpo, $A_{\text{máx}}$ es la absorbancia medida a la longitud de onda de absorción máxima del tinte, A_{280} es la absorbancia medida a 280 nm, ϵ_P es el coeficiente de extinción molar de la proteína de anticuerpo y ϵ_{tinte} es el coeficiente de extinción molar del tinte. Debería observarse que para obtener un GDS exacto, el conjugado debería estar libre de tinte no conjugado.

10 Para un marcaje eficaz, el grado de sustitución debería entrar típicamente entre 3-20 moles de tinte por mol de anticuerpo. Como es bien conocido en la materia, el GDS que proporciona un marcaje óptimo dependerá del anticuerpo y, en algunos, casos, un GDS mayor puede proporcionar un marcaje mejorado. El marcaje óptimo se determina empíricamente preparando conjugados de tinte en un intervalo de GDS y comparando las intensidades de fluorescencia medidas. Se muestran ejemplos en las figuras.

Ejemplo 43

Preparación de conjugados de tinte de glicoproteínas oxidadas con peryodato

15 Se tratan muestras de 5 mg de anticuerpo de IgG de cabra (que tiene una cadena polisacáridica fijada a la proteína) en 1 ml de acetato 0,1 M, NaCl 0,135 M, pH 5,5 con 2,1 mg de metaperyodato de sodio en hielo durante un periodo de tiempo determinado experimentalmente como suficiente para dar como resultado la cantidad deseada de grupos aldehído en la glicoproteína, que se hacen reaccionar entonces con el compuesto 5. Se detienen las reacciones mediante la adición de 30 μ l de etilenglicol. Se purifican los anticuerpos en una columna Sephadex G25
20 empaquetada en PBS pH 7,2. Se añade 1/10 de volumen de bicarbonato de sodio 1 M para elevar el pH y se añade el compuesto 5 a un cociente molar de tinte a proteína de 50:1. Se agita la reacción a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo determinado experimentalmente como suficiente para dar como resultado el cociente de tinte/proteína deseado. Se añade cianoborohidruro de sodio a una concentración final de 10 mM y se agita la reacción durante 4 horas a temperatura ambiente. Se purifican los conjugados de anticuerpo por diálisis y en
25 columnas de Sephadex G25 como se describe anteriormente. Las glicoproteínas oxidadas con peryodato en geles y transferencias pueden marcarse también, esencialmente como se describe en Estep y Miller, 1986, Anal. Biochem. 157: 100-10.

Ejemplo 44

Preparación de un conjugado de proteína-tinte usando un tinte reactivo con tiol

30 Se prepara una disolución de β -galactosidasa, una proteína rica en grupos tiol libres, en PBS (2,0 mg en 400 μ l). Se trata entonces la disolución de proteína con una disolución 10 mg/l del derivado de maleimida compuesto 9 en DMF. Se retira el tinte no reaccionado en una columna de centrifugación. Se estima el grado de sustitución por el tinte usando el coeficiente de extinción del tinte libre, como se describe en el Ejemplo 42. Se estima la concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm, corregida por la absorbancia del compuesto 9 a esa longitud de onda.

35 Ejemplo 45

Preparación de conjugados de aminodextrano-tinte

Se preparan conjugados de aminodextrano-tinte como sigue, usando aminodextrano de PM 70.000 (50 mg) derivatizados con una media de 13 grupos amino como ejemplo. Se disuelve el aminodextrano (50 mg) a 10 mg/ml en NaHCO_3 0,1 M. Se añaden compuesto 7, 13, 14, 19, 25 o 60 para dar un cociente de tinte/dextrano de
40 aproximadamente 10-15. Después de 6-12 horas, se purifica el conjugado resultante en SEPHADEX G-50 y se eluye con agua. Se conjugan típicamente 6-10 mol de tinte con dextrano de PM 70.000.

Ejemplo 46

Preparación de microesferas marcadas con tinte

45 Las microesferas pueden marcarse con un tinte de la presente invención usando cualquiera de una serie de protocolos conocidos. Se describen ejemplos a continuación.

Las microesferas modificadas químicamente para tener grupos funcionales tales como amino, carboxilo o aldehído sobre la superficie pueden marcarse en superficie conjugando covalentemente los grupos de superficie con los correspondientes tintes reactivos, como se enumeran en la Tabla 1. Por ejemplo, las microesferas modificadas con amina se conjugan fácilmente con los tintes de la invención a través de ésteres de succinimidilo, tales como los
50 compuestos 7, 13, 14, 19, 25 o 60.

Una proteína marcada con tinte, preparada como se describe anteriormente, puede acoplarse covalentemente a través de sus residuos amino con grupos carboxilato en una microesfera usando 3-(dimetilaminopropil)carbodiimida

de etilo (EDAC). Como alternativa, la proteína marcada con tinte puede adsorberse pasivamente sobre las microesferas. Por ejemplo, se suspenden microesferas modificadas con carboxilato en una disolución de proteína marcada con tinte, se deja adsorber pasivamente la proteína sobre las microesferas y se retira la proteína en exceso por centrifugación y lavado. Las micropartículas de un tamaño que no pueda centrifugarse se separan de la proteína en exceso mediante diálisis a través de una membrana semipermeable con un corte de alto PM o por cromatografía de filtración en gel.

Las microesferas biotinizadas pueden tratarse con una estreptavidina, avidina o anti-biotina conjugada con un tinte de la invención, como se describe anteriormente.

Ejemplo 47

10 Preparación de conjugados de nucleótido-tinte

Los nucleótidos conjugados con los tintes de la invención pueden prepararse fácilmente por un especialista en la materia siguiendo procedimientos publicados bien conocidos tales como los descritos en M. Nimmakayalu *et al.*, 2000, *Biotechniques* 28, 518-522; Muhlegger *et al.*, 1990, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 371, 953-965 y Giaid *et al.*, 1989, *Histochemistry* 93, 191-196. Se describen a continuación ejemplos de conjugaciones particulares.

15 Se añaden los compuestos 7, 13, 14, 19, 25 o 60 en 100 μ l de DMF y 5 μ l de trietilamina a 2 mg de 5'-trifosfato de 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina (Sigma-Aldrich) en 100 μ l de agua. Después de 3 horas, se evapora la disolución y se purifica el residuo por HPLC. Se liofilizan las fracciones de producto, dando conjugado nucleotídico fluorescente.

20 Como alternativa, se preparan conjugados de tinte fluorescente de 5'-trifosfato de desoxiuridina a partir de 5'-trifosfato de 5-(3-amino-1-propinil)-2'-desoxiuridina, o tratando un nucleótido tiolado o un nucleótido tiofosfatado con un tinte reactivo con tiol de la invención (tal como el compuesto 9 de maleimida).

Como alternativa, se hace reaccionar 5'-trifosfato de 2'-(o 3')-2-aminoetilaminocarboniladenosina con un ligero exceso del compuesto 7, 13, 14, 19, 25 o 60, seguido de precipitación con etanol, y se purifica el producto modificado con ribosa por HPLC preparativa.

Ejemplo 48

25 Preparación de conjugados de oligonucleótido-tinte

Se disuelve una secuencia del cebador M13 de 18 bases modificado en 5'-amina (aproximadamente 100 μ g) en 4 μ l de agua. Se añade a esto 250 μ g del compuesto 7, 13, 14, 19, 25 o 60 en 100 μ l de borato de sodio 0,1 M, pH 8,5. Después de 16 horas, se añaden 10 μ l de NaCl 5 M y 3 volúmenes de etanol frío. Se enfría la mezcla a -20 °C, se centrifuga y se decanta el sobrenadante, se aclara el sedimento con etanol y se disuelve entonces el sedimento en 100 μ l de agua. Se purifica el oligonucleótido marcado por HPLC. Se recoge el pico deseado y se evapora, dando el conjugado de oligonucleótido-tinte fluorescente.

Ejemplo 49

Análisis celular por citometría de flujo usando conjugados de tinte-anticuerpo

35 Los anticuerpos específicos de analito conjugados con un compuesto de tinte de la presente invención (concretamente, anticuerpos marcados) son útiles para el análisis de células sanguíneas (por ejemplo, en muestras de sangre completa) por citometría de flujo. Se usan los anticuerpos marcados para marcar (teñir) proteínas celulares y se detectan las células marcadas usando un citómetro de flujo.

40 Se tiñen típicamente muestras (100 μ l) de sangre completa (preferiblemente recogida en EDTA) con conjugado de anticuerpo-tinte durante 30-60 minutos en la oscuridad a una concentración de tinte-conjugado de 1 μ g o menos por 0,1 ml de sangre. Después de la tinción, se añaden a la muestra 2 ml de disolución de lisis 1X FACS™ (BD Bioscience, San José, CA), se mezcla la muestra a velocidad media en un mezclador por vórtex y se incuba entonces a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifuga la muestra a 2-500 g (preferiblemente 2-300) durante 5 minutos y se decanta el sobrenadante. Se lava la muestra (se resuspende en 2 ml de tampón de lavado de BSA al 0,5 %/PBS, se mezcla y se centrifuga) dos veces, se resuspende en 0,5 ml de tampón de lavado o 150 μ l de tampón de estabilización de la fijación y se mantiene a 4 °C hasta el análisis citométrico de flujo.

50 Se lleva a cabo preferiblemente el análisis de las células teñidas usando un citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences, San José, CA) equipado con un láser azul (488 nm), otro rojo (~633 nm) y otro violeta (405 nm). La óptica de detección incluye detección en un canal de detección de fluorescencia de 525/50 nm. Los biopolímeros fluorescentes que incorporan compuestos de tinte tales como el compuesto 7, 13 y 25 exhiben un máximo de excitación que coincide estrechamente con la emisión a 405 nm del láser violeta, y se mide la emisión de los biopolímeros en el canal de detección de 525/50 nm. Se ajusta el citómetro de flujo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevan a cabo los análisis citométricos de flujo de la muestra de células teñidas según los protocolos del fabricante, y se analizan los datos usando técnicas estándares bien conocidas en el campo, obteniendo una intensidad de fluorescencia mediana para la población celular de interés.

Se entenderá que el conjugado de anticuerpo particular usado, los componentes de reacción específicos y las condiciones de reacción particulares usados puedan tener un efecto sobre los resultados obtenidos. Debería llevarse a cabo una experimentación rutinaria para determinar los componentes de reacción preferidos, tales como tampones o disoluciones de lisis, y las condiciones de reacción, incluyendo tiempos y temperaturas de tinción. Dicha optimización rutinaria de las condiciones de ensayo es una práctica estándar en el campo de los ensayos basados en inmunotinción.

Ejemplo 50

Conjugados de tinte de anticuerpos anti-CD4, -CD8 y -CD45

Se prepararon conjugados de tinte usando anticuerpos específicos de CD4 y CD45 (clones SK3 y 2D1, respectivamente, de BD Biosciences, San José, CA), conjugado cada uno, en preparaciones separadas, con los compuestos 7, 13 y 25, en un intervalo de cocientes de tinte a proteína. Se prepararon los conjugados de anticuerpo-tinte esencialmente como se describe en el ejemplo 42 anterior. Se usaron los conjugados de anticuerpo de los anticuerpos de CD4 y CD45 para analizar los linfocitos en muestras de sangre completa, esencialmente como se describe en el ejemplo 49 anterior.

Los datos indicaban un cociente de tinte a proteína óptimo para cada par de anticuerpo-tinte. Para cada anticuerpo, el cociente de tinte a proteína óptimo para cada uno de los tres tintes aparecía a cocientes similares. Comparando los diferentes anticuerpos conjugados con los mismos tintes, los cocientes de tinte a proteína óptimos eran significativamente diferentes, observándose la fluorescencia óptima al mayor cociente para CD4. En estos experimentos, no se observó un autoapagamiento apreciable con los conjugados de tinte de CD4 que tienen cocientes de tinte a proteína mayores que el cociente óptimo (en el intervalo probado), permaneciendo la fluorescencia al nivel óptimo. En contraposición, se observó un autoapagamiento significativo con conjugados de tinte de CD45 con un cociente de tinte a proteína mayor que el cociente óptimo. Comparando la tinción de fluorescencia máxima obtenida usando cada compuesto de tinte, el compuesto 7 procuraba mejor tinción de fluorescencia que el compuesto 13, que procuraba mejor tinción de fluorescencia que el compuesto 25.

Los resultados indican que los tres conjugados de tinte son útiles en la preparación de reactivos de detección específicos de antígeno para ensayos de inmunofluorescencia analizados por citometría de flujo. En general, se determina empíricamente cada uno de los cocientes de tinte a proteína óptimos (por optimización rutinaria) para cada anticuerpo específico para marcar.

Ejemplo 51

Conjugados de tinte de anticuerpos anti-CD3, -CD4, -CD8 y -CD45

Se prepararon conjugados de tinte usando cuatro anticuerpos diferentes, anticuerpos de CD3, CD4, CD8 y CD45 (clones SK7, SK3, SK1 y 2D1, respectivamente, de BD Biosciences, San José, CA), cada uno conjugado, en preparaciones separadas, con el compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte/proteína. Se prepararon los conjugados de anticuerpo-tinte esencialmente como se describe en el ejemplo 42 anterior. Se usaron los conjugados de tinte de los anticuerpos de CD3, CD4, CD8 y CD45 para analizar las células linfocíticas en muestras de sangre completa esencialmente como se describe en el ejemplo 49 anterior.

Se resumen los resultados de los análisis en las Figuras 3-6, que muestran gráficos de la intensidad de fluorescencia de la población linfocítica marcada por el conjugado de tinte, graficado frente al cociente de tinte a proteína para cada conjugado de tinte. En las Figuras 3-5, se reseña la intensidad de fluorescencia como un "índice de tinción" que proporciona una medida de la intensidad de fluorescencia de una población de células teñidas frente a la señal medida de una población no teñida ("negativa") (concretamente, de fondo) respecto a la anchura de la distribución de la fluorescencia medida en la población no teñida (véase Maecker *et al.*, 2004, "Cytometry Part A" 62A:169-173. El índice de tinción se define como

$$\text{Índice de tinción} = (S - U) / (2 \cdot \text{DE negativa}),$$

en la que S es la intensidad de fluorescencia mediana (IFM) medida en la población de células teñidas, U la IFM de la población de células no teñidas y DE negativa la desviación estándar de la intensidad de fluorescencia de la población de células no teñidas. En la Figura 6, se reseña la intensidad de fluorescencia como la intensidad de fluorescencia mediana (IFM). Debido a que el anticuerpo de CD45 se une a todos los linfocitos, no había poblaciones de linfocitos no teñidas para usar como medida del fondo en estos experimentos, y no pudo calcularse el índice de tinción.

Se proporcionan en la Tabla 4 los cocientes de tinte a proteína óptimos para cada uno de los anticuerpos conjugados con tinte.

Tabla 4

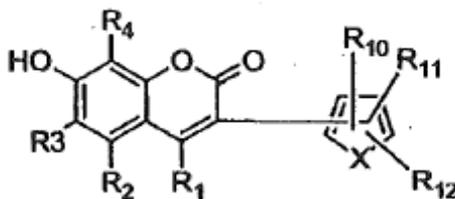
Cocientes óptimos de tinte-proteína

Especificidad de anticuerpo	Cociente óptimo de tinte a proteína
CD3	5
CD4	25
CD8	28
CD45	9

- 5 La Figura 3 muestra un gráfico de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD3 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte a proteína. El índice de tinción máximo obtenido demuestra que los conjugados de tinte de este anticuerpo de CD3 marcado con compuesto 7 posibilitan la discriminación de la población de linfocitos teñidos frente a la fluorescencia de fondo en un ensayo de fluorescencia citométrica de flujo. Para esta combinación de anticuerpo y tinte, se observó autoapagamiento a cocientes de tinte a proteína superiores al óptimo.
- 10 La Figura 4 muestra un gráfico de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD4 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte a proteína. El índice de tinción máximo obtenido demuestra que los conjugados de tinte de este anticuerpo de CD4 marcado con compuesto 7 posibilitan la discriminación de la población de linfocitos teñidos frente a la fluorescencia de fondo en un ensayo de inmunofluorescencia citométrica de flujo. Para esta combinación de anticuerpo y tinte, se observó poco autoapagamiento a cocientes de tinte a proteína superiores al óptimo, proporcionando un amplio intervalo de cocientes utilizables.
- 15 La Figura 5 muestra una gráfica de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD8 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cocientes de tinte a proteína. El índice de tinción máximo obtenido demuestra que los conjugados de tinte de este anticuerpo de CD8 marcado con compuesto 7 posibilita la discriminación de la población de linfocitos teñidos frente a la fluorescencia de fondo en un ensayo de inmunofluorescencia citométrica de flujo. Para esta combinación de anticuerpo y tinte, se observó poco autoapagamiento a cocientes de tinte a proteína superiores al óptimo, proporcionando un amplio intervalo de cocientes utilizables.
- 20 La Figura 6 muestra una gráfica de los datos obtenidos usando conjugados de tinte de anticuerpos de CD45 conjugados con compuesto 7 en un intervalo de cociente de tinte a proteína. Como la IFM depende, por ejemplo, de la ganancia del fotodetector, la IFM máxima obtenida no indica directamente la utilidad del conjugado de tinte para distinguir las poblaciones celulares. Sin embargo, se observó que los conjugados de tinte de este anticuerpo de CD45 marcado con compuesto 7 proporcionan un marcaje adecuado de las poblaciones de linfocitos para uso en ensayos de inmunofluorescencia citométrica de flujo. Para esta combinación de anticuerpo y tinte, se observó autoapagamiento a cocientes de tinte a proteína superiores al óptimo, indicando un intervalo más estrecho de cocientes utilizables.
- 25
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura de fórmula 3:



en la que

- 5 X es O o S;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están sustituidos opcionalmente a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

- 10 R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico L-RG o WSG; o alquilo o alcoxilo que están sustituidos opcionalmente a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico, L-RG o WSG;

- 15 RG es un grupo químicamente reactivo que es acrilamida, amina, ácido carboxílico, éster activado de ácido carboxílico, acilazida, acilnitrilo, aldehído, haluro de alquilo, anhídrido, haluro de arilo, azida, aziridina, boronato, diazoalcano, halogenoacetamida, halogenotriazina, hidrazina, hidroxilamina, imidoéster, isotiocianato, maleimida, complejo de platino reactivo, haluro de sulfonilo o derivado de psoraleno;

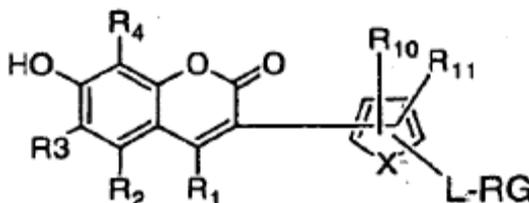
L es un ligador opcional que es nulo, alquilo, alcoxilo, tionalquilo, aminoácido, sulfoaminoácido, poliamina, polietilenglicol, arilo o heteroarilo;

WSG es un grupo hidrosoluble que es sulfonato, tiosulfato, fosfonato, boronato, amonio, piridio, quinolio o acridio;

al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ contiene L-RG; y

- 20 al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ es WSG.

2. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura de fórmula 4:



en la que

X es O o S;

- 25 R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están sustituidos opcionalmente a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

- 30 R₁₀, y R₁₁ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico L-RG o WSG; o alquilo o alcoxilo que están sustituidos opcionalmente a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico, L-RG o WSG;

RG es un grupo químicamente reactivo como se define en la reivindicación 1;

L es un ligador opcional como se define en la reivindicación 1;

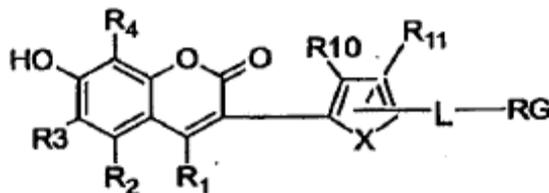
WSG es un grupo hidrosoluble como se define en la reivindicación 1;

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ contiene L-RG;

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es WSG; y

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ contiene un sulfonato.

3. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura de fórmula 5:



5 en la que

X es O o S;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, cloro o fluoro;

R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

RG es un grupo químico reactivo como se define en la reivindicación 1;

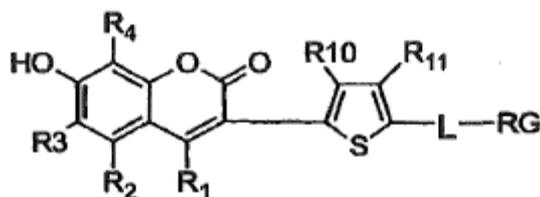
10 L es un ligador opcional como se define en la reivindicación 1, y

en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que RG es un éster activado de ácido carboxílico, acilazida, acilnitrilo, aldehído, haluro de alquilo, anhídrido, haluro de arilo, azida, aziridina, halogenoacetamida, halogenotriazina, amina, hidrazina, hidroxilamina, imidoéster, isotiocianato o maleimida.

15 5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que L es nulo, alquilo, alcoxilo, tioalquilo, aminoácido, sulfonaminoácido, poliamina o polietilenglicol que tiene 3-20 átomos de carbono.

6. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura de fórmula 6:



en la que

20 R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrogeno, cloro o fluoro;

R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

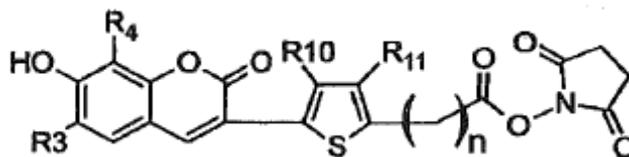
RG es un grupo químico reactivo como se define en la reivindicación 1;

L es un ligador opcional que es nulo, alquilo, alcoxilo, tioalquilo, aminoácido, sulfoaminoácido, poliamina, polietilenglicol, arilo, arilalquilo o heteroarilo, y

25 en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que RG es un éster activado de ácido carboxílico, acilazida, acilnitrilo, aldehído, haluro de alquilo, anhídrido, haluro de arilo, azida, aziridina, halogenoacetamida, halogenotriazina, amina, hidrazina, hidroxilamina, imidoéster, isotiocianato o maleimida.

8. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura de fórmula 7:



en la que

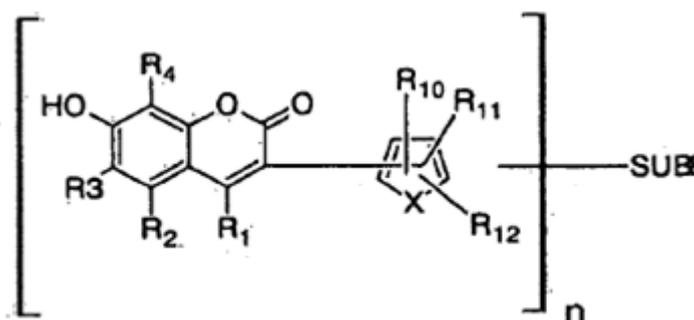
R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, cloro o fluoro;

5 R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

n es un entero de 1 a 10; y

en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

9. Un conjugado de tinte que tiene la estructura de fórmula 11:



10 en la que

X es O o S;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tior, alquiltior, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

15 R₁₀, R₁₁ y R₁₂ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tior, alquiltior, ariltior, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico o WSG; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico o WSG;

WSG es un grupo hidrosoluble que es un sulfonato, tiosulfato, fosfonato, boronato, amonio, piridio, quinolio o acridio;

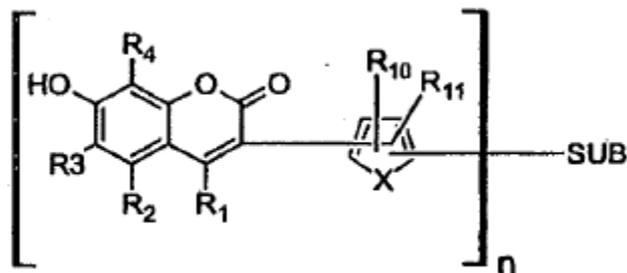
n es un entero de 1 a 35;

20 SUB es un sustrato que es un biopolímero o un anticuerpo;

al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ está unido covalentemente a SUB a través de un ligador opcional L, en el que L es nulo, alquilo, alcoxilo, tioalquilo, aminoácido, sulfoaminoácido, poliamina, polietilenglicol, arilo o heteroarilo; y

al menos uno de R₁₀, R₁₁ y R₁₂ es WSG.

10. El conjugado de tinte de la reivindicación 9, que tiene la estructura de fórmula 12:



en la que

X es O o S;

5 R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo o ácido borónico; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo o ácido borónico;

R₁₀ y R₁₁ son independientemente H, halógeno, alquilo, alcoxilo, ariloxilo, tiol, alquiltiol, ariltiol, azido, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, ácido borónico o WSG; o alquilo o alcoxilo que están opcionalmente sustituidos a su vez una o más veces con halógeno, amino, hidroxilo, sulfonilo, fosfonilo, carbonilo, ácido borónico o WSG;

10

WSG es un grupo hidrosoluble como se define en la reivindicación 9;

n es un entero de 1 a 35;

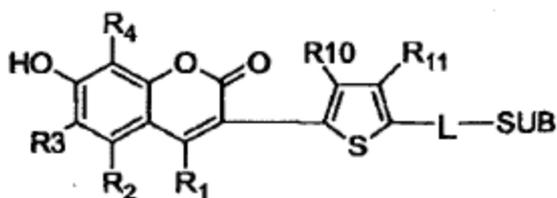
SUB es un sustrato como se define en la reivindicación 9;

15 al menos uno de R₁₀ y R₁₁ está unido covalentemente a SUB a través de un ligador L opcional como se define en la reivindicación 9;

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es WSG; y

al menos uno de R₁₀ y R₁₁ contiene un sulfonato.

11. El conjugado de tinte de la reivindicación 9, que tiene la estructura de fórmula 13:



20 en la que

X es O o S;

R₁, R₂, R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno, cloro o fluoro;

R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, cloro, fluoro o sulfonato;

L es un ligador opcional como se define en la reivindicación 9;

25 SUB es un sustrato como se define en la reivindicación 9; y

en la que al menos uno de R₁₀ y R₁₁ es un sulfonato.

12. El conjugado de tinte de la reivindicación 11, en el que L es nulo, alquilo, alcoxilo, tioalquilo, aminoácido, sulfoaminoácido, poliamina o polietilenglicol que tiene 3-20 átomos de carbono.

13. Un método de detección de un analito en una muestra que comprende
- a) combinar dicha muestra con un reactivo de detección que comprende un conjugado de tinte de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en condiciones en que dicho reactivo de detección forme un complejo con dicho analito;
- 5 b) detectar dichos complejos.
14. Un kit que comprende al menos un compuesto de tinte reactivo que tiene la estructura de fórmula 3, fórmula 4, fórmula 5, fórmula 6 o fórmula 7.
15. Un kit que comprende al menos un conjugado de tinte que tiene la estructura de fórmula 11, fórmula 12 o fórmula 13.
- 10 16. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

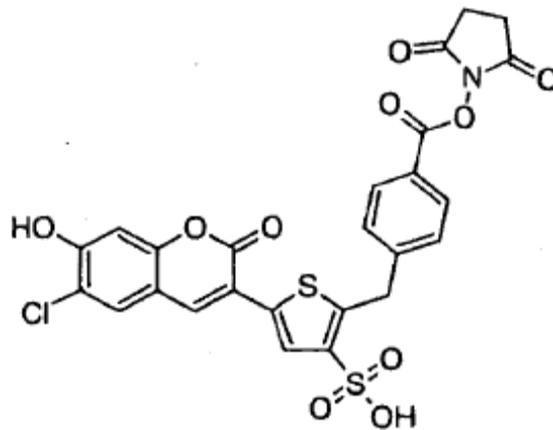
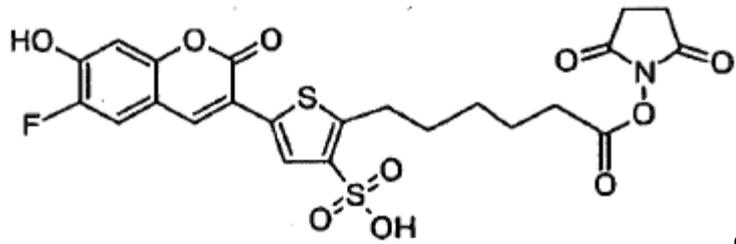
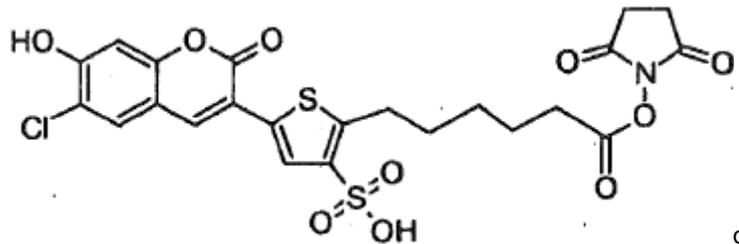


FIGURA 1A

Método A: Condensación catalizada por base

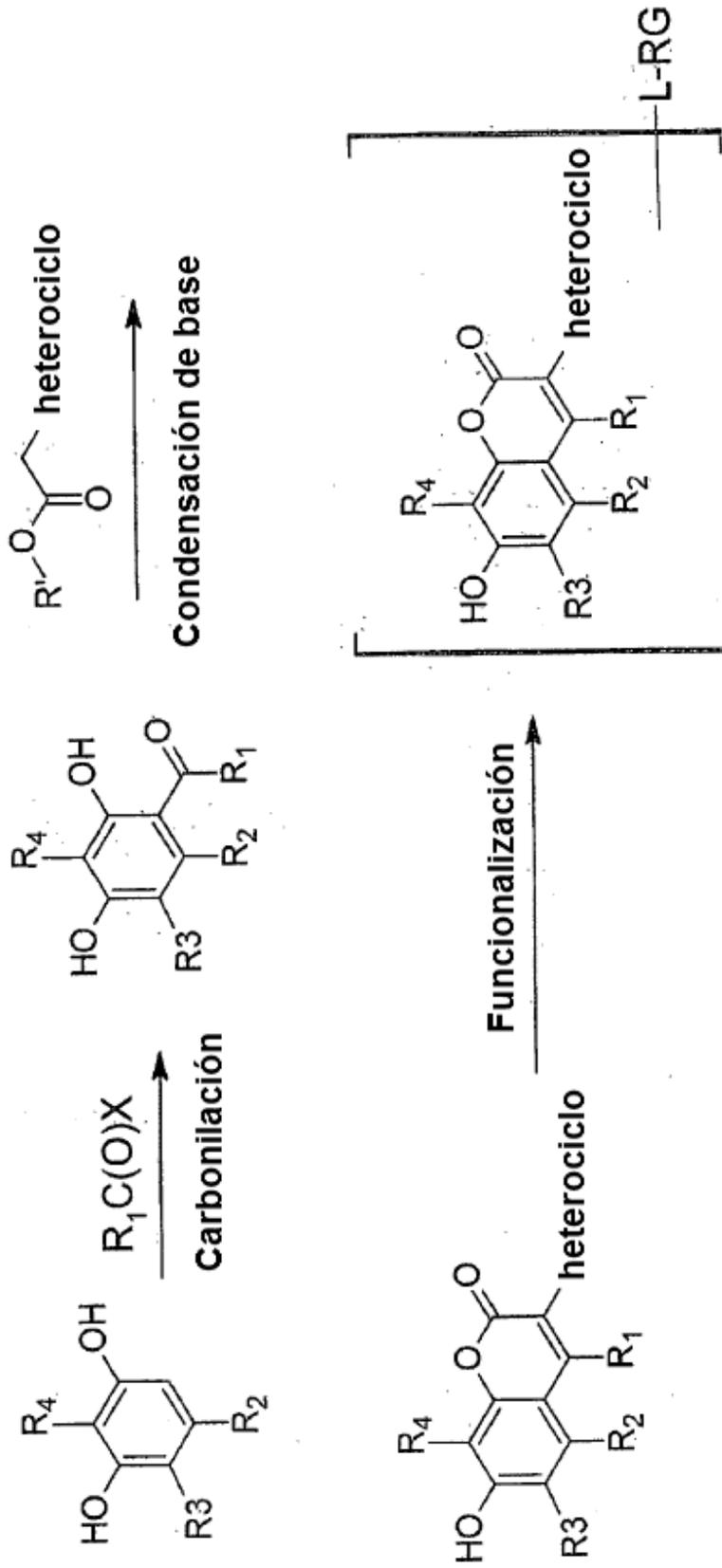


FIGURA 1B

Método B: Condensación basada en anhídrido acético

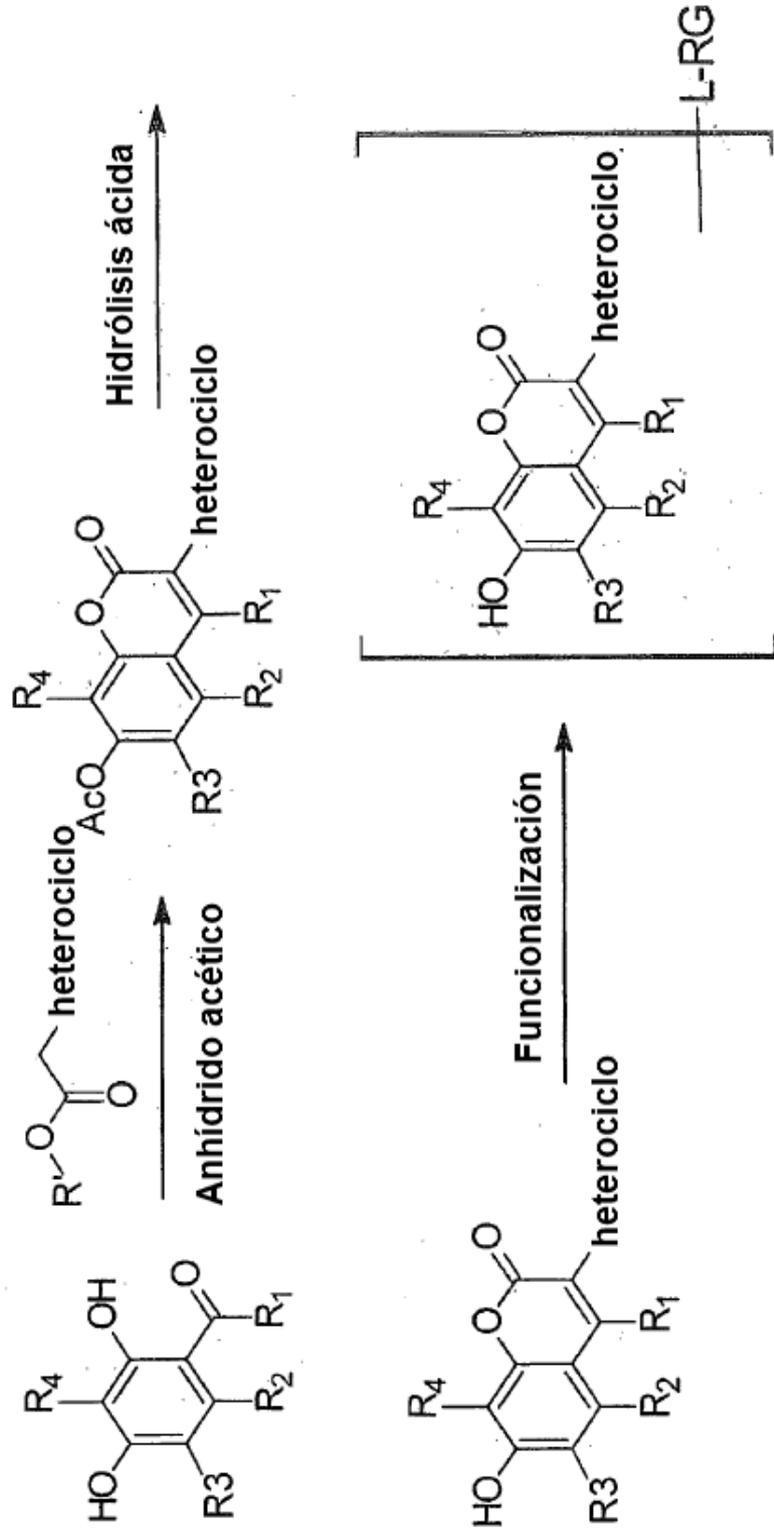


FIGURA 2

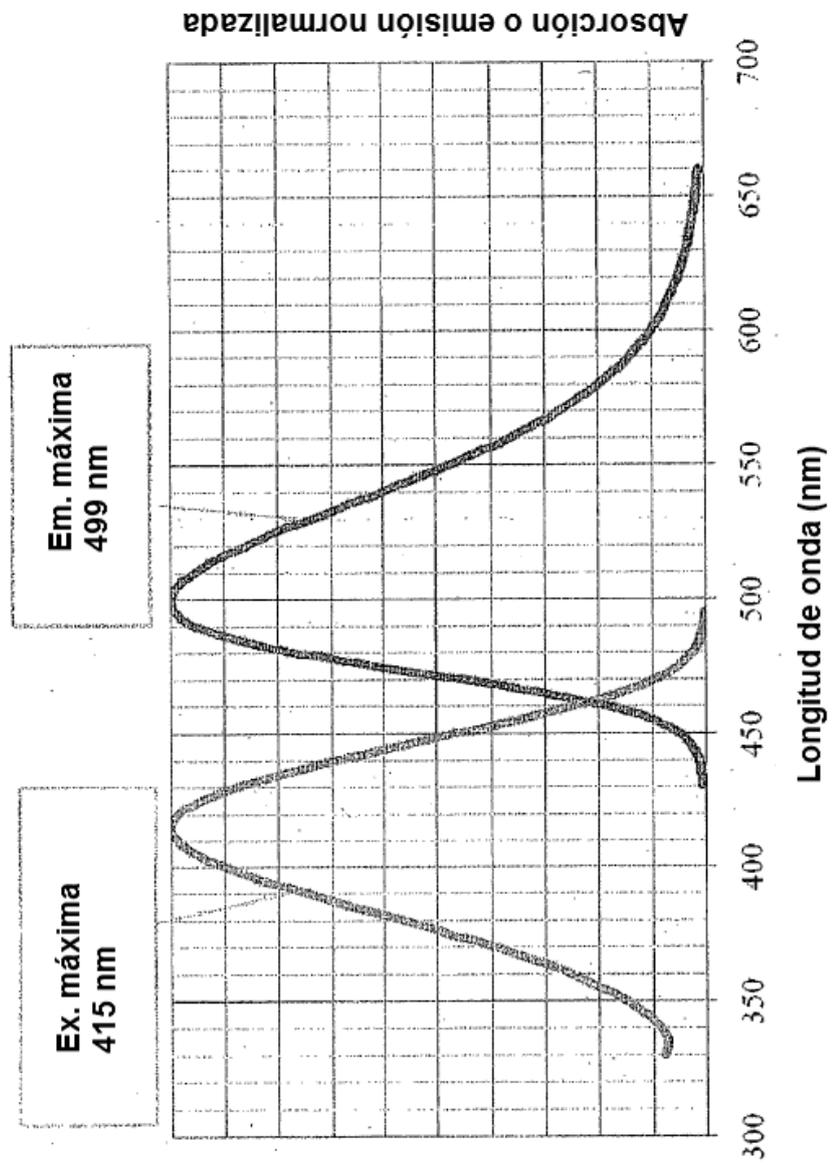


FIGURA 3
Conjugados de anticuerpo anti-CD3-compuesto 7

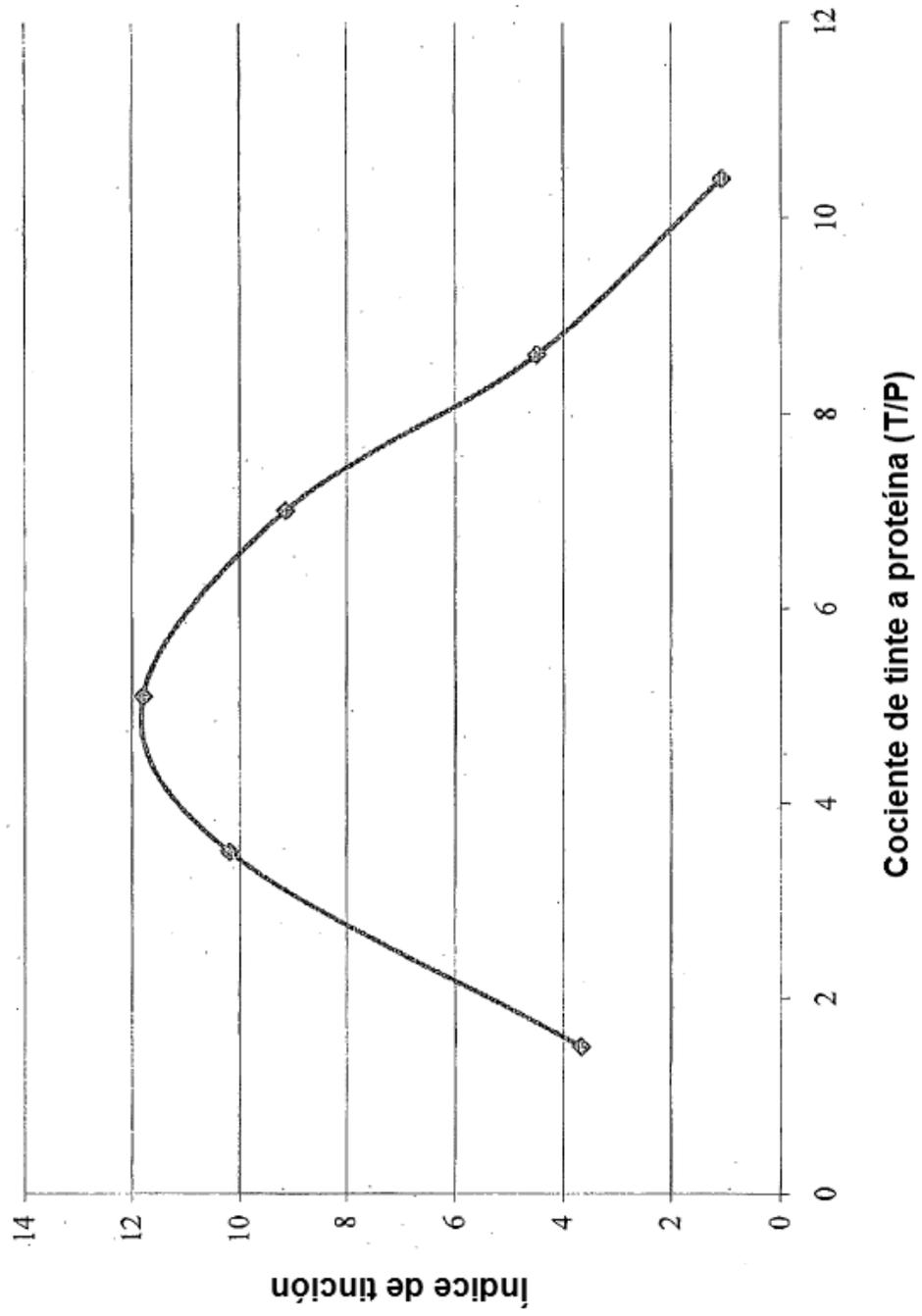


FIGURA 4
Conjugados de anticuerpo anti-CD4-compuesto 7

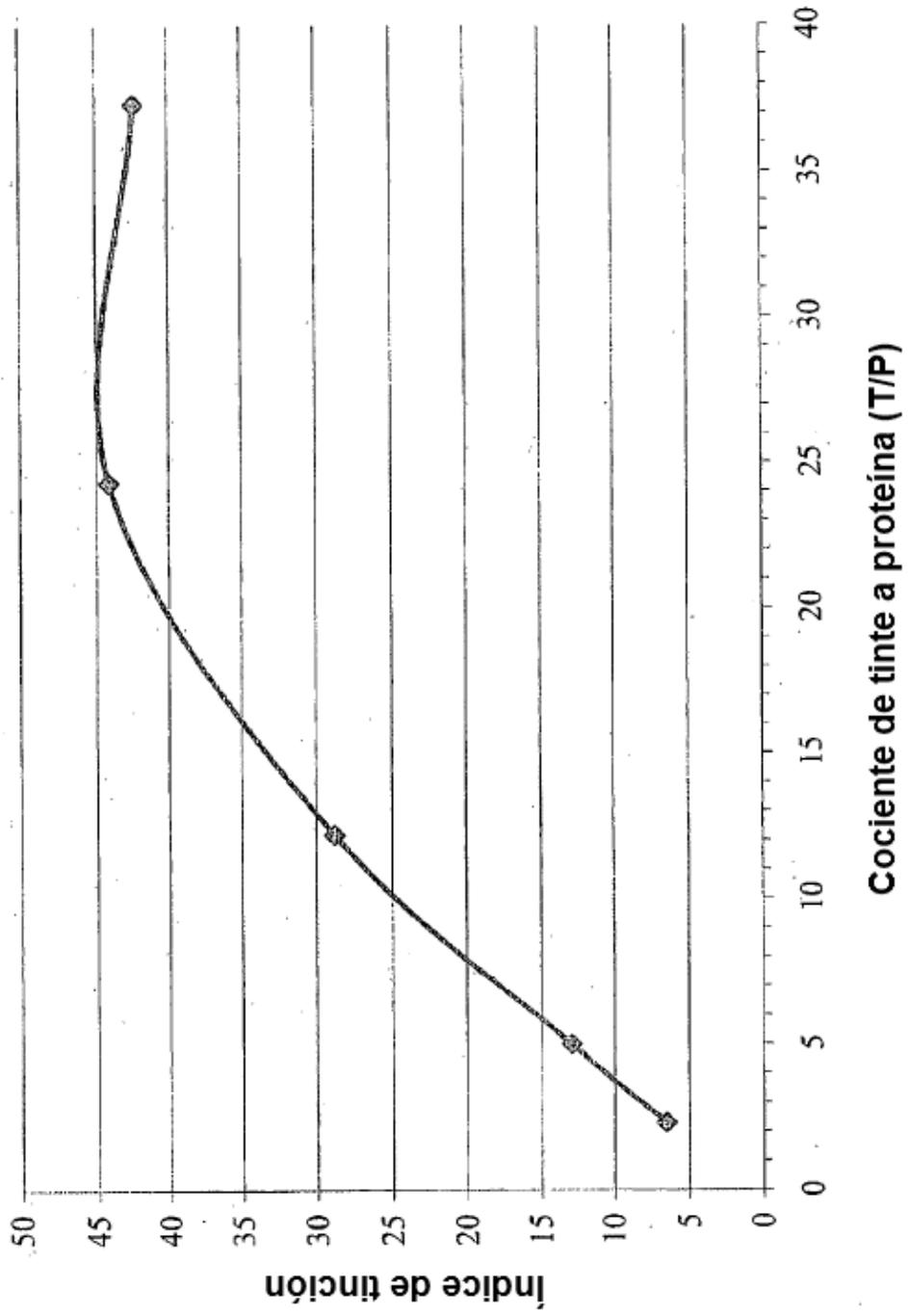


FIGURA 5
Conjugados de anticuerpo anti-CD8-compuesto 7

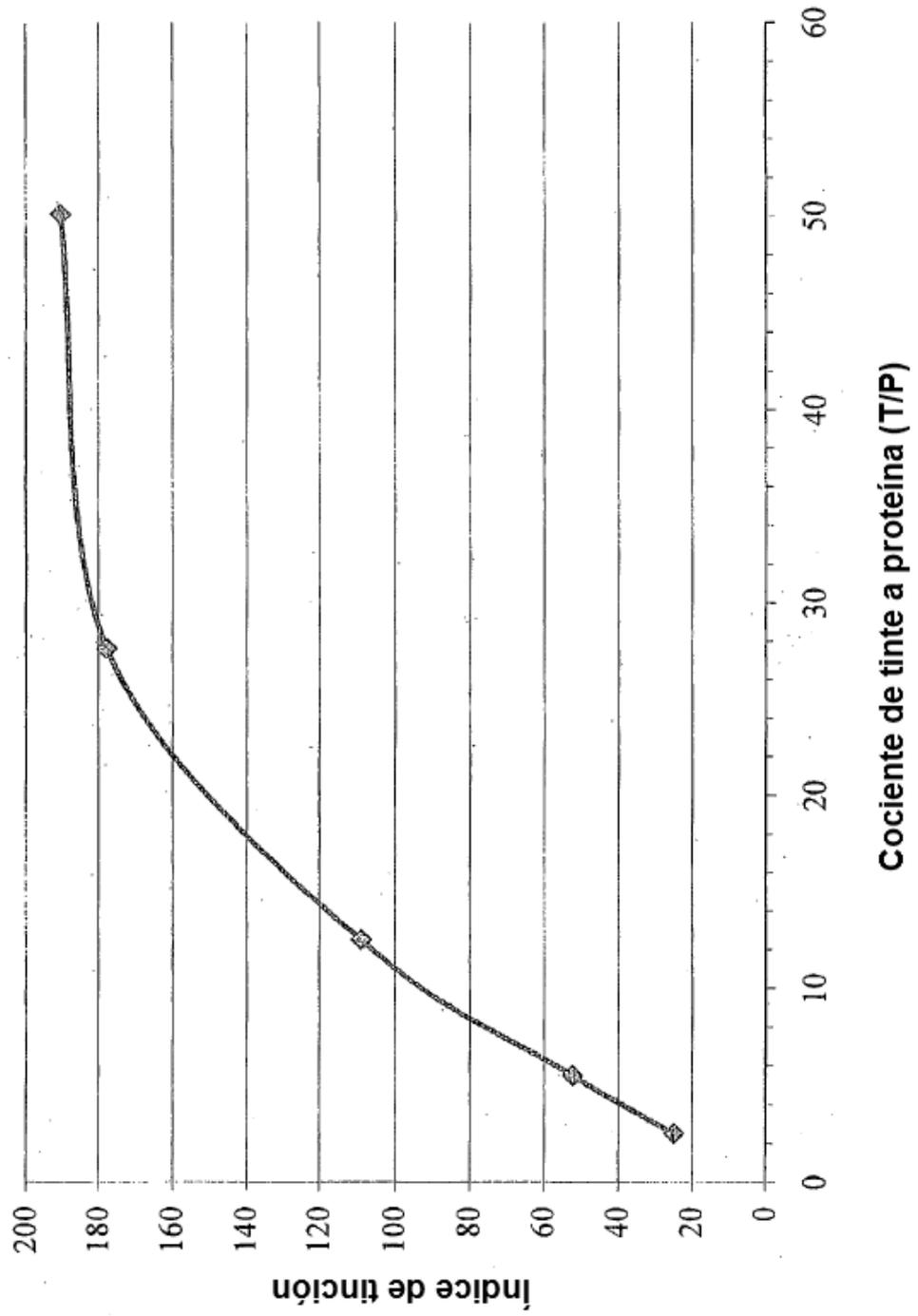


FIGURA 6
Conjugados de anticuerpo anti-CD45-compuesto 7

