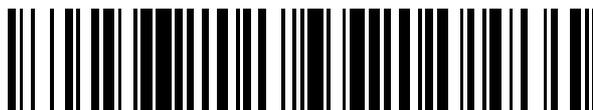


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 952**

51 Int. Cl.:

C09B 23/08 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2007 E 07762058 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2035505**

54 Título: **Formación de imágenes fluorescentes ópticas que utiliza colorantes cianina**

30 Prioridad:

19.05.2006 US 419457

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

04.07.2016

73 Titular/es:

**LI-COR, INC. (100.0%)
4647 SUPERIOR STREET
LINCOLN NE 68504, US**

72 Inventor/es:

**KOVAR, JOY;
CHEN, JIYAN;
DRANEY, DANIEL R.;
OLIVE, D. MICHAEL;
VOLCHECK, WILLIAM M.;
XU, XINSHE;
LUGADE, ANANDA G. y
NARAYANAN, NARASIMHACHARI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 575 952 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

Formación de imágenes fluorescentes ópticas que utiliza colorantes cianina

5 Antecedentes de la invención

Los colorantes cianina han sido ampliamente utilizados para el marcado de ligandos o biomoléculas en una variedad de aplicaciones, tales como la secuenciación de ADN. Véase, por ejemplo, la patente de US nº 5.571.388 para ver ejemplos de métodos de identificación de cadenas de ADN que utilizan colorantes cianina. Los científicos prefieren el uso de colorantes cianina en aplicaciones biológicas, entre otras razones, porque muchos de ellos operan en la región del IR cercano (NIR) del espectro (600-1.000 nm). Esto hace que dichos colorantes cianina sean menos susceptibles a la interferencia por autofluorescencia de las biomoléculas.

Otras ventajas de los colorantes cianina son: 1) los colorantes cianina absorben y fluorescen la luz intensamente; 2) muchos colorantes cianina no palidecen rápidamente bajo el microscopio de fluorescencia; 3) pueden obtenerse derivados de colorantes cianina que sean reactivos de acoplamiento simples y eficaces; 4) están disponibles muchas estructuras y procedimientos de síntesis, y la clase de colorantes es versátil; y 5) los colorantes cianina son relativamente pequeños (típicamente tienen un peso molecular de aproximadamente 1.000 daltons), de modo que no provocan una interferencia estérica apreciable que pueda reducir la capacidad de una biomolécula marcada para alcanzar su sitio de unión o llevar a cabo su función.

A pesar de sus ventajas, muchos de los colorantes cianina conocidos presentan una serie de desventajas. Algunos colorantes cianina conocidos no son estables en presencia de ciertos reactivos de uso común en los bioensayos. Entre dichos reactivos se incluyen hidróxido de amonio, ditioneitol (DTT), aminas primarias y secundarias, y persulfato de amonio (APS). Además, algunos colorantes cianina conocidos carecen de la estabilidad térmica y la fotoestabilidad necesarias para aplicaciones biológicas, tales como la secuenciación del ADN y la determinación del genotipo.

Por estas razones se necesitan colorantes cianina estables y mejorados, especialmente para su utilización en el marcado de biomoléculas y la formación de imágenes ("imaging") *in vivo* para el diagnóstico y la valoración del pronóstico del cáncer y otras enfermedades.

El cáncer de próstata humano surge inicialmente como una neoplasia en el epitelio de la próstata. La progresión del tumor hacia una enfermedad invasiva y metastásica se puede producir a lo largo de un período de años y se retrasa mediante las terapias de ablación de andrógenos en las primeras etapas. A menudo, las células tumorales que retoman el crecimiento independientemente de los andrógenos metastatizan en los ganglios linfáticos y huesos. Las complicaciones de las metástasis óseas son la causa más común de la mortalidad por cáncer de próstata.

La expresión del receptor de EGF se eleva aproximadamente en un factor de 100 sobre los niveles celulares normales en muchos tipos de células tumorales, incluidas las de próstata, por lo que es un buen biomarcador general para la identificación del tumor. Su ligando, el EGF, ha sido marcado con éxito con FITC para caracterizar la unión al receptor y la endocitosis (véase Carraway, K. L., 3ª, y R. A. Cerione, 1993. *Biochemistry* 32(45):12039-12045), y con Cy5.5 para monitorizar la terapia de dianas moleculares en xenoinjertos de cáncer de mama *in vivo* (véase Shi K. y otros 2003, *Cancer Research* 63:7870-7875). Sin embargo, ni el FITC ni el Cy5.5 proporcionan la sensibilidad necesaria para la formación de imágenes ópticas.

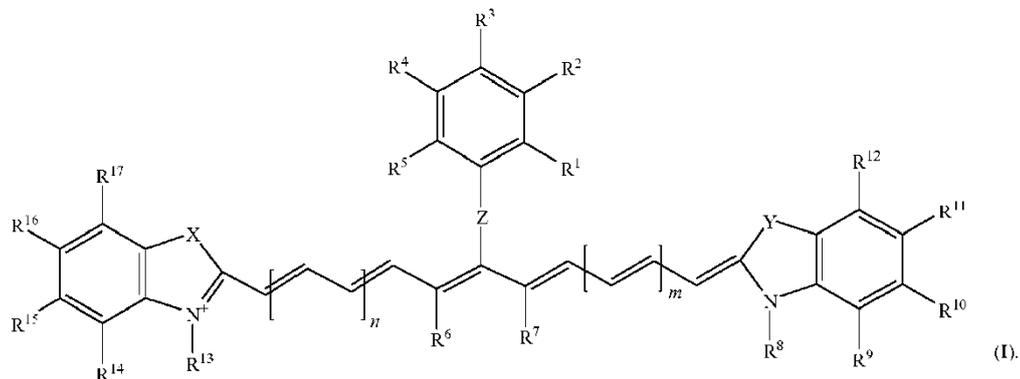
El documento WO 2007/005222 A2 da a conocer colorantes cianina como silenciadores de NIR y sondas biológicas en ensayos biológicos. El documento WO 02/24815 A1 da a conocer colorantes cianina para su utilización en el marcado de biomoléculas. El documento WO 00/16810 A da a conocer agentes de contraste fluorescentes en el infrarrojo cercano. El documento WO 2004/065491 A1 da a conocer colorantes fluorescentes y conjugados de estos colorantes con biomoléculas.

Existe una necesidad de composiciones y métodos sensibles para detectar y medir un objetivo interno de forma no invasiva. Dichas composiciones y métodos deben facilitar el análisis de las respuestas a diversas terapias. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

Breve resumen de la invención

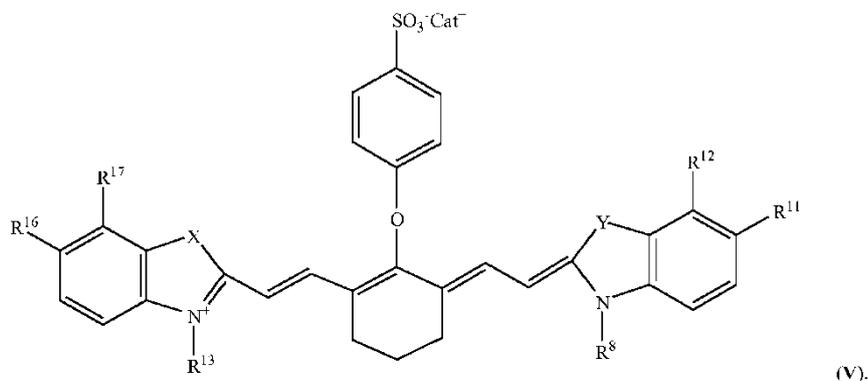
Los compuestos de la presente invención, tal como se definen en las reivindicaciones 1 a 3, resuelven, por lo menos, algunos de los problemas de la técnica descrita anteriormente. Mientras que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 3, la siguiente descripción proporciona, además, una divulgación general.

En un aspecto de la presente divulgación general, se da a conocer un compuesto de fórmula (I):



- 5 Z es O, S o NR³⁵, donde R³⁵ es H o alquilo; R¹-R⁵ son, cada uno independientemente, H, alquilo, halo, carboxilo, amino o SO₃⁻Cat⁺, donde Cat⁺ es un catión y, por lo menos, uno de entre R¹-R⁵ es SO₃⁻Cat⁺; R⁶ y R⁷ son, cada uno, H, alquilo, o forman opcionalmente un anillo junto con el grupo  al que están unidos; m y n son, cada uno independientemente, números enteros comprendidos entre 0 y 5; X e Y son, cada uno independientemente, O, S, Se o CR¹⁹R²⁰, donde R¹⁹ y R²⁰ son, cada uno independientemente, alquilo, o forman opcionalmente un anillo junto con el átomo de carbono al que están unidos; R⁸ y R¹³ son, cada uno independientemente, alquilo, (CH₂)_rR²⁵ o (CH₂)_rR¹⁸, donde, por lo menos, uno de entre R⁸ y R¹³ es (CH₂)_rR¹⁸, y donde r es un número entero comprendido entre 1 y 50, y R²⁵ es un grupo funcional no reactivo, por ejemplo, que no reacciona directamente con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol, y R¹⁸ es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol; y R⁹-R¹² y R¹⁴-R¹⁷ son, cada uno independientemente, H, alquilo, halo, amino, sulfonato, R²¹COOH, R²¹OR²², R²¹SR²² o R²¹COOR²², donde R²¹ es un enlace o alquileo y R²² es alquilo, o R¹¹ y R¹² forman, opcionalmente, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático, o R¹⁶ y R¹⁷ forman, opcionalmente, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático.

En otro aspecto de la presente divulgación general, se da a conocer un compuesto de fórmula (V):



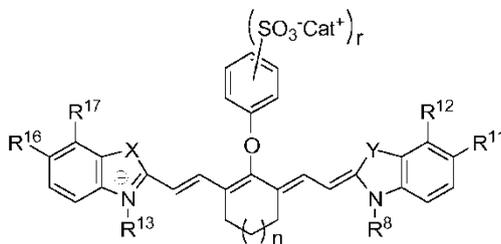
- 25 Cat⁺ es un catión; X e Y son, cada uno independientemente, O, S, Se o (CH₃)₂C; y R⁸ y R¹³ son, cada uno independientemente, alquilo, (CH₂)_rR²⁵ o (CH₂)_rR¹⁸; donde, por lo menos, uno de entre R⁸ y R¹³ es (CH₂)_rR¹⁸, y donde r es un número entero comprendido entre 1 y 20, y R²⁵ es un grupo funcional no reactivo que no reacciona directamente con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol, y R¹⁸ es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol; R¹¹ y R¹² son H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático; y R¹⁶ y R¹⁷ son H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático. Para alcanzar la neutralidad de carga, el experto en la materia entenderá que, tras el primer grupo "sulfonato" adicional de R¹¹, R¹², R¹⁶ y R¹⁷, se añade un Cat⁺. El primer grupo "sulfonato" se neutraliza con el nitrógeno cuaternario.

En otro aspecto de la presente divulgación general, un método de marcado de una biomolécula utilizando un colorante de fórmula (I) comprende hacer reaccionar un colorante de fórmula (I) con la biomolécula. La biomolécula marcada con colorante resultante es otro aspecto de la divulgación general.

En otro aspecto de la presente divulgación general, un método de marcado de una biomolécula utilizando un colorante de fórmula (V) comprende hacer reaccionar un colorante de fórmula (V) con la biomolécula. La biomolécula marcada con colorante resultante es otro aspecto de la divulgación general.

En otro aspecto de la presente divulgación general, un kit para el marcado de biomoléculas comprende un colorante de fórmula (I) y un tampón. De modo similar, en otro aspecto de la presente divulgación general, un kit para el marcado de biomoléculas comprende un colorante de fórmula (V) y un tampón.

5 En otro aspecto, la presente divulgación da a conocer un compuesto de fórmula XXI:



10 donde Cat^+ es un catión; r es un número entero igual a 1, 2 o 3; X e Y son, cada uno independientemente, O, S, Se o $(\text{CH}_3)_2\text{C}$; y R^8 y R^{13} son, cada uno independientemente, alquilo, L- R^{25} o L-B; donde, por lo menos, uno de entre R^8 y R^{13} es L-B; R^{25} es un grupo funcional no reactivo que no reacciona directamente con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol; L es un conector; B es un ligando; n es 0, 1, 2 o 3; R^{11} y R^{12} son, cada uno independientemente, F, H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático; y R^{16} y R^{17} son, cada uno independientemente, F, H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático.
15 Para alcanzar la neutralidad de carga, el experto en la materia apreciará que, tras el primer grupo "sulfonato" adicional de R^{11} , R^{12} , R^{16} y R^{17} , se añade un Cat^+ . El primer grupo "sulfonato" se neutraliza con el nitrógeno cuaternario. Preferentemente, r es 1.

20 La presente divulgación da a conocer las características anteriores y otras, y las ventajas de la presente invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la presente divulgación, tomada en consideración junto con los ejemplos adjuntos. La descripción detallada y los ejemplos son únicamente ilustrativos de la presente invención y no limitativos del alcance de la misma, que resulta definida en las reivindicaciones adjuntas.

25 Breve descripción de las figuras

30 La figura 1 (gráficos A-D) ilustra un análisis "in-cell Western" *in vitro* que caracteriza la eficacia de EGF-colorante 8b (del ejemplo 8) en las líneas celulares PC3M-LN4 y 22Rv1. En el gráfico A, se representa la unión de la sonda EGF-colorante 8b a las células PC3M-LN4 y 22Rv1. El gráfico B ilustra la baja afinidad del colorante 8b no conjugado y corresponde al nivel basal observado en el gráfico A. En los gráficos C y D, la unión del colorante 8b marcado se bloqueó eficazmente mediante el pretratamiento de las células con EGF (C) o C225 (D) sin marcar.

35 La figura 2 muestra un perfil de eliminación de EGF-colorante 8b de un ratón negativo a tumor a lo largo de un período de 24 horas.

40 La figura 3 muestra un perfil de eliminación de EGF-colorante 8b de un tumor lateral subcutáneo a lo largo de un período de 96 horas.

La figura 4 muestra el desarrollo temporal para el crecimiento tumoral de PC3M-LN4 a lo largo de un período de 6 semanas.

La figura 5 muestra el desarrollo temporal para el crecimiento tumoral de 22Rv1 a lo largo de un período de 6 semanas.

45 La figura 6 (gráficos A-C) muestra los promedios para tumores de próstata 22Rv1 y PC3M-LN4 tras la extirpación. El gráfico A representa el volumen; el gráfico B representa el peso y el gráfico C es la SNR calculada a partir de imágenes tomadas en la semana 6.

50 La figura 7 ilustra comparaciones de los ganglios linfáticos de los tratamientos con EGF-colorante 8b y C225 + EGF-colorante 8b.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

55 "Alcanoílo" significa un grupo alquilo-C(O) en el que el grupo alquilo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos alcanoílo representativos se incluyen metoílo, etoílo y similares.

“Alcoxi” significa un grupo alquilo-O- en el que el grupo alquilo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos alcoxi representativos se incluyen metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, heptoxi y similares.

5 “Alcoxialquilo” significa un grupo alquilo-O-alquileo en el que el alquilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Entre los grupos alcoxialquilo representativos se incluyen metoxietilo, etoximetilo, n-butoximetilo y ciclopentilmetiloxietilo.

10 “Alcoxycarbonilo” significa un grupo éster; es decir, un grupo alquilo-O-CO- en el que el alquilo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos alcoxycarbonilo representativos se incluyen metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, t-butiloxycarbonilo y similares.

“Carbamoilo” significa un grupo alquilo-NH-CO- en el que el grupo alquilo es tal como se define en la presente memoria. Los grupos carbamoilo preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es un alquilo inferior.

15 “Alcoxycarbonilalquilo” significa un grupo alquilo-O-CO-alquileo en el que el alquilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Entre los alcoxycarbonilalquilos representativos se incluyen metoxycarbonilmetilo y etoxycarbonilmetilo, metoxycarboniletilo y similares.

20 “Alquilo” significa un grupo hidrocarburo alifático, que puede ser de cadena lineal o ramificada, con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferidos tienen de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono en la cadena. Ramificado significa que uno o más grupos alquilo inferiores, tales como metilo, etilo o propilo, están unidos a una cadena de alquilo lineal. “Alquilo inferior” significa de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, preferentemente de aproximadamente 5 átomos de carbono en la cadena, que puede ser lineal o ramificada. El alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo alquilo”, que pueden ser iguales o diferentes, entre los que se incluyen los grupos halo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, amino, carbamoilo, acilamino, aroilamino, carboxilo, alcoxycarbonilo, aralquiloalcoxycarbonilo o heteroaralquiloalcoxycarbonilo. Entre los grupos alquilo representativos se incluyen metilo, trifluorometilo, ciclopropilmetilo, ciclopentilmetilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, 1-butilo, n-pentilo, 3-pentilo, metoxietilo, carboximetilo, metoxycarboniletilo, benciloxycarbonilmetilo y piridilmetiloxycarbonilmetilo.

30 En otros aspectos, “alquilo” es un grupo alifático saturado, incluidos grupos alquilo de cadena lineal sustituidos y no sustituidos, grupos alquilo ramificados sustituidos y no sustituidos, y grupos cicloalquilo sustituidos y no sustituidos. El término “alquilo” incluye grupos alcoxi, haloalquilo, hidroxialquilo y alquiloalquilo éter. En formas de realización preferidas, un alquilo de cadena lineal o ramificada tiene 50 átomos de carbono o menos en su cadena principal, más preferentemente 30 o menos, y todavía más preferentemente 10 o menos. Los cicloalquilos preferidos tienen de 3 a 10 átomos de carbono en su estructura de anillo, y más preferentemente tienen de 3 a 6 átomos de carbono. “Alquilo inferior” significa un grupo alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono en su cadena principal, más preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo cíclicos pueden ser monocíclicos o policíclicos y contener de 3 a 12 átomos por anillo, aunque preferentemente de 1 a 9 átomos en la cadena principal. Entre los sustituyentes preferidos en una cadena principal de alquilo se incluyen radicales alquilo sustituidos o no sustituidos, grupos halo, carboxilo, amino y sulfonato.

45 En otros aspectos, “alqueno” y “alquino” son sustituyentes alifáticos insaturados análogos en longitud y posible sustitución a los radicales alquilo descritos anteriormente, pero que contienen, por lo menos, un doble o triple enlace, respectivamente.

50 “Alquileo” significa una cadena de hidrocarburo bivalente lineal o ramificada con entre 1 y aproximadamente 6 átomos de carbono. El alquileo está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes del grupo alquileo”, que pueden ser iguales o diferentes, entre los que se incluyen los grupos halo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxi, carbamoilo, carboxilo, ciano, arilo, heteroarilo u oxo. El alquileo está opcionalmente interrumpido por un heteroátomo, es decir, un carbono del mismo está sustituido por -O-, -S(=O)_m (donde m es 0-2), o -NR'- (donde R' es un alquilo inferior). Entre los grupos alquileo preferidos se incluyen los grupos alquileo inferiores que tienen de 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono. Entre los grupos alquileo representativos se incluyen metileno, etileno y similares.

55 “Alquilenoxycarbonilo” significa un grupo éster; es decir, un grupo alquileo-O-CO- en el que el alquileo es tal como se define en la presente memoria.

60 “Alquilenocarbamoilo” significa un grupo alquileo-NH-CO- en el que el grupo alquileo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos alquilenocarbamoilo preferidos se incluyen aquellos en los que el grupo alquileo es un alquileo inferior.

65 “Alquilenosulfonilo” significa un grupo alquileo-SO₂- en el que el grupo alquileo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos alquilenosulfonilo preferidos se incluyen aquellos en los que el grupo alquileo es un alquileo inferior.

“Alquilenosulfonilcarbamoilo” significa un grupo alquileo-SO₂-NH-CO- en el que el grupo alquileo es tal como se define en la presente memoria.

5 “Alquenileno” significa una cadena de hidrocarburo bivalente lineal o ramificada que contiene, por lo menos, un doble enlace carbono-carbono. El alquenileno está sustituido opcionalmente con uno o más “sustituyentes del grupo alquileo”, tal como se definen en la presente memoria. El alquenileno está opcionalmente interrumpido por un heteroátomo, es decir, un carbono del mismo está sustituido por -O-, -S(O)_m (donde m es 0-2) o -NR' (donde R' es un alquilo inferior). Entre los alquenilenos representativos se incluyen -CH=CH-, -CH₂CH=CH-, -C(CH₃)=CH-, -CH₂CH=CHCH₂- y similares.

10 “Alquilsulfinilo” significa un grupo alquilo-SO- en el que el grupo alquilo es tal como se ha definido anteriormente. Los grupos alquilsulfinilo preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es un alquilo inferior.

15 “Alquilsulfonilo” significa un grupo alquilo-SO₂- en el que el grupo alquilo es tal como se define en la presente memoria. Los grupos alquilsulfonilo preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es un alquilo inferior.

20 “Alquilsulfonilcarbamoilo” significa un grupo alquilo-SO₂-NH-CO- en el que el grupo alquilo es tal como se define en la presente memoria. Los grupos alquilsulfonilcarbamoilo preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es un alquilo inferior.

“Alquiltio” significa un grupo alquilo-S- en el que el grupo alquilo es tal como se define en la presente memoria. Los grupos alquiltio preferidos son aquellos en los que el grupo alquilo es un alquilo inferior. Entre los grupos alquiltio representativos se incluyen metiltio, etiltio, i-propiltio, heptiltio y similares.

25 “Alquinilo” significa un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con entre 2 y aproximadamente 15 átomos de carbono, que contiene, por lo menos, un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinilo preferidos tienen de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono. Los grupos alquinilo más preferidos contienen de 2 a aproximadamente 4 átomos de carbono. “Alquinilo inferior” significa alquinilo con entre 2 y aproximadamente 4 átomos de carbono. El grupo alquinilo puede estar sustituido con uno o más sustituyentes del grupo alquilo, tal como se definen en la presente memoria. Entre los grupos alquinilo representativos se incluyen etinilo, propinilo, n-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, n-pentinilo, heptinilo, octinilo, decinilo y similares.

35 “Alquiniloxi” significa un grupo alquinilo-O- en el que el grupo alquinilo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos alquiniloxi representativos se incluyen propiniloxi, 3-butiniloxi y similares.

40 “Amino” significa un grupo de fórmula Y₁Y₂N-, en el que Y₁ e Y₂ son, independientemente, hidrógeno; acilo; o alquilo, o bien Y₁ e Y₂, considerados junto con el N a través del cual están unidos Y₁ e Y₂, forman un azaheterociclo con entre 4 y 7 miembros. Entre los grupos amino representativos se incluyen amino (H₂N-), metilamino, dimetilamino, dietilamino y similares. Alternativamente, “amino” es un grupo -NRR', en el que R y R' pueden ser iguales o diferentes y pueden ser H o alquilo. Preferentemente, por lo menos uno de entre R y R' es H. Opcionalmente, se puede añadir un sustituyente adicional, obteniéndose un ion de amonio cuaternario.

45 “Aminoalquilo” significa un grupo amino-alquileo en el que el amino y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Entre los grupos aminoalquilo representativos se incluyen aminometilo, aminoetilo, dimetilaminometilo y similares.

50 “Aralquenilo” significa un grupo arilo-alquenileno en el que el arilo y el alquenileno son tal como se definen en la presente memoria. Los aralquenilos preferidos contienen un resto alquenileno inferior. Un grupo aralquenilo representativo es el 2-feneteno.

“Aralquiloxi” significa un grupo aralquilo-O-, en el que el aralquilo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos aralquiloxi representativos se incluyen benciloxi, naft-1-ilmetoxi, naft-2-ilmetoxi y similares.

55 “Aralquiloalquilo” significa un grupo aralquilo-O-alquileo en el que el aralquilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Un grupo aralquiloalquilo representativo es el benciloietilo.

“Aralquiloalquilo” significa un grupo aralquilo-O-alquileo en el que el aralquilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Un grupo aralquiloalquilo representativo es el benciloietilo.

60 “Aralquilo” significa un grupo arilo-alquileo en el que el arilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Los aralquilos preferidos contienen un resto alquilo inferior. Entre los grupos aralquilo representativos se incluyen bencilo, 2-fenetilo, naftalenometilo y similares.

65 “Aralquiltio” significa un grupo aralquilo-S- en el que el aralquilo es tal como se define en la presente memoria. Un grupo aralquiltio representativo es el benciltio.

“Aroflo” significa un grupo arilo-CO- en el que el arilo es tal como se define en la presente memoria. Entre los aroños representativos se incluyen benzoilo, naft-1-oílo y naft-2-oílo.

5 “Ariilo” significa un sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico con entre 6 y aproximadamente 14 átomos de carbono, preferentemente con entre 6 y aproximadamente 10 átomos de carbono. El ariilo está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes de sistema de anillo”, que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se definen en la presente memoria. Entre los grupos ariilo representativos se incluyen fenilo y naftilo.

10 “Ariileno” significa un radical de sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico bivalente con entre 6 y aproximadamente 14 átomos de carbono, preferentemente con entre 6 y aproximadamente 10 átomos de carbono. El radical ariileno está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes de sistema de anillo”, que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se definen en la presente memoria. Entre los grupos ariilo representativos se incluyen fenileno y naftileno.

15 “Ariilosulfonilo” significa un grupo ariileno-SO₂- en el que el grupo ariileno es tal como se define en la presente memoria.

20 “Ariilenoxicarbonilo” significa un grupo éster; es decir, un grupo ariileno-O-CO- en el que el ariileno es tal como se define en la presente memoria.

“Ariilencarbamoílo” significa un grupo ariileno-NHCO-, en el que el ariileno es tal como se define en la presente memoria.

25 “Ariilosulfonilcarbamoílo” significa un grupo ariileno-SO₂-NH-CO- en el que el ariileno es tal como se define en la presente memoria.

“Ariilsulfiniilo” significa un grupo ariilo-SO- en el que el grupo ariilo es tal como se define en la presente memoria.

30 “Ariilquinilo” significa un grupo ariilo-alquinileno- el que el ariilo y el alquinileno son tal como se definen en la presente memoria. Entre los grupos ariilquinilo representativos se incluyen fenilacetileno y 3-fenilbut-2-inilo.

“Ariilcarbamoílo” significa un grupo ariilo-NHCO- en el que el ariilo es tal como se define en la presente memoria.

35 “Ariilsulfiniilo” significa un grupo ariilo-SO- en el que el grupo ariilo es tal como se define en la presente memoria. Los grupos ariilsulfiniilo preferidos son aquellos en los que el grupo ariilo es un fenilo sustituido.

“Ariilsulfonilo” significa un grupo ariilo-SO₂- en el que el grupo ariilo es tal como se define en la presente memoria. Los grupos ariilsulfonilo preferidos son aquellos en los que el grupo ariilo es un fenilo sustituido.

40 “Ariilsulfonilcarbamoílo” significa un grupo ariilo-SO₂-NH-CO- en el que el grupo ariilo es tal como se define en la presente memoria. Los grupos ariilsulfonilcarbamoílo preferidos son aquellos en los que el grupo ariilo es un fenilo sustituido.

45 “Anillo aromático”, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye restos monocíclicos aromáticos o policíclicos fusionados con entre 5 y 12 miembros, que pueden incluir de cero a cuatro heteroátomos seleccionados entre el grupo que comprende oxígeno, azufre, selenio y nitrógeno. Entre los ejemplos de grupos ariilo se incluyen benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina, naftaleno, benzotiazolina, benzotiofeno, benzofuranos, indol, bencindol, quinolina, etc. El grupo ariilo puede estar sustituido, en una o más posiciones, con grupos halo, alquilo, alcoxi, alcoxycarbonilo, haloalquilo, ciano, sulfonato, aminosulfonilo, ariilo, sulfonilo, aminocarbonilo, carboxi, acilamino, alquilsulfonilo, amino y sustituyentes sustituidos o no sustituidos.

50 “Biomolécula” es una molécula natural o sintética que se utiliza en sistemas biológicos. Entre las biomoléculas preferidas se incluyen una proteína, un péptido, un sustrato de enzima, una hormona, un anticuerpo, un antígeno, un hapteno, una avidina, una estreptavidina, un carbohidrato, un oligosacárido, un polisacárido, un ácido nucleico, un ácido desoxinucleico, un fragmento de ADN, un fragmento de ARN, trifosfatos de nucleótidos, trifosfatos de terminadores aciclo y PNA.

60 “Bencilo” significa un grupo fenil-CH₂. “Bencilo sustituido” significa un grupo bencilo en el que el anillo de fenilo está sustituido con uno o más sustituyentes de sistema de anillo. Entre los bencilos representativos se incluyen 4-bromobencilo, 4-metoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo y similares.

65 “Carbamoílo” significa un grupo de fórmula Y₁Y₂NCO-, en el que Y₁ e Y₂ son, independientemente, hidrógeno; acilo; o alquilo, o bien Y₁ e Y₂, considerados junto con el N a través del cual están unidos Y₁ e Y₂, forman un azaheterociclilo con entre 4 y 7 miembros. Entre los grupos carbamoílo representativos se incluyen los grupos carbamilo (H₂NCO-), dimetilaminocarbamoílo (Me₂NCO-) y similares.

“Carboxi” y “carboxilo” significan un grupo HO(O)C- (es decir, un ácido carboxílico).

“Carboxialquilo” significa un grupo HO(O)C-alquileo-, en el que el alquileo es tal como se define en la presente memoria. Entre los carboxialquilos representativos se incluyen carboximetilo y carboxietilo.

“Cicloalquilo” significa un sistema de anillo no aromático monocíclico o multicíclico con entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 átomos de carbono, preferentemente con entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 átomos de carbono. Los anillos cicloalquílicos preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. El cicloalquilo está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes de sistema de anillo”, que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se definen en la presente memoria. Entre los cicloalquilos monocíclicos representativos se incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. Entre los cicloalquilos multicíclicos representativos se incluyen 1-decalina, norbornilo, adamantilo y similares. El prefijo espiro antes del cicloalquilo significa que los sustituyentes geminales de un átomo de carbono se sustituyen para formar 1,1-cicloalquilo. “Cicloalquileo” significa un cicloalquilo bivalente que tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Entre los grupos cicloalquileo preferidos se incluyen 1,2-, 1,3-, 1,4- cis o trans-ciclohexileo.

“Cicloalqueno” significa un sistema de anillo no aromático monocíclico o multicíclico con entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 átomos de carbono, preferentemente con entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 átomos de carbono, que contiene, por lo menos, un doble enlace carbono-carbono. Los anillos de cicloalqueno preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. El cicloalqueno está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes de sistema de anillo”, que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se definen en la presente memoria. Entre los grupos cicloalqueno monocíclicos representativos se incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo y similares. Un cicloalqueno multicíclico representativo es el norbornenilo.

De forma genérica, “colorante de cianina” se refiere a un compuesto que tiene dos anillos heterocíclicos que contienen nitrógeno, sustituidos o no sustituidos, unidos por un puente insaturado.

“Halo” o “halógeno” significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

“Heteroaralqueno” significa un grupo heteroarilo-alquileo en el que el heteroarilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Los heteroaralquenos preferidos contienen un resto alquileo inferior. Entre los grupos heteroaralqueno representativos se incluyen 4-piridilvinilo, tieniletlenilo, piridiletlenilo, imidazoliletlenilo, piraziniletlenilo y similares.

“Heteroaralquilo” significa un grupo heteroarilo-alquileo en el que el heteroarilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Los heteroaralquilos preferidos contienen un grupo alquileo inferior. Entre los grupos heteroaralquilo representativos se incluyen tienilmetilo, piridilmetilo, imidazolilmetilo, pirazinilmetilo y similares.

“Heteroaralquiloxi” significa un grupo heteroaralquilo-O- en el que el heteroaralquilo es tal como se define en la presente memoria. Un grupo heteroaralquiloxi representativo es el 4-piridilmetiloxi.

“Heteroaralquino” significa un grupo heteroarilo-alquileo en el que el heteroarilo y el alquileo son tal como se definen en la presente memoria. Los heteroaralquinos preferidos contienen un resto alquileo inferior. Entre los grupos heteroaralquino representativos se incluyen pirid-3-ilacetilenilo, quinolin-3-ilacetilenilo, 4-piridiletlenilo y similares.

“Heteroaróilo” significa un grupo heteroarilo-CO- en el que el heteroarilo es tal como se define en la presente memoria. Entre los grupos heteroaróilo representativos se incluyen tifenóilo, nicotinoílo, pirrol-2-ilcarbonilo, piridinoílo y similares.

“Heterociclilo” significa un sistema de anillo no aromático saturado monocíclico o multicíclico que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos en el anillo, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos en el anillo, en el que uno o más de los átomos del sistema de anillo son elementos distintos de carbono, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre. Los heterociclilos preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. El prefijo aza, oxa o tia antes de heterociclilo significa que, por lo menos, está presente un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como átomo del anillo. El heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o más “sustituyentes de sistema de anillo”, que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se definen en la presente memoria. El átomo de nitrógeno o azufre del heterociclilo está opcionalmente oxidado al correspondiente N-óxido, S-óxido o S,S-dióxido. Entre los anillos heterociclilo monocíclicos representativos se incluyen piperidilo, pirrolidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiazolidinilo, 1,3-dioxolanilo, 1,4-dioxanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidropirranilo y similares.

“Heteroarilo” significa un sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico que tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos en el anillo, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos en

el anillo, en el que uno o más de los átomos del sistema de anillo son elementos distintos de carbono, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre. Los heteroarilos preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. El "heteroarilo" está opcionalmente sustituido con uno o más "sustituyentes de sistema de anillo", que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se definen en la presente memoria. El prefijo aza, oxa o tia antes de heteroarilo significa que, por lo menos, está presente un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre, respectivamente, como átomo del anillo. Un átomo de nitrógeno de un heteroarilo está opcionalmente oxidado al correspondiente N-óxido. Entre los heteroarilos representativos se incluyen pirazinilo, furanilo, tienilo, piridilo, pirimidinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazolilo, furazanilo, pirrolilo, pirazolilo, triazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, pirazinilo, piridazinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo, imidazo[1,2-a]piridina, imidazo[2,1-b]tiazolilo, benzofurazanilo, indolilo, azaindolilo, bencimidazolilo, benzotienilo, quinolinilo, imidazolilo, tienopiridilo, quinazolinilo, tienopirimidilo, pirrolopiridilo, imidazopiridilo, isoquinolinilo, benzoazaindolilo, 1,2,4-triazinilo, benzotiazolilo y similares.

"Heteroarileno" significa un radical de sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico bivalente que tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 átomos en el anillo, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos en el anillo, en el que uno o más de los átomos del sistema de anillo son elementos distintos de carbono, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno o azufre. Los heteroarilenos preferidos contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 átomos en el anillo. El "heteroarileno" está opcionalmente sustituido con uno o más "sustituyentes de sistema de anillo", que pueden ser iguales o diferentes, y son tal como se definen en la presente memoria.

"Heteroarilenoalquilcarbonilo" significa un grupo heteroarileno-O-CO- en el que el heteroarileno es tal como se define en la presente memoria.

"Heteroarilenoalquilcarbamoilo" significa un grupo heteroarileno-NH-CO- en el que el grupo heteroarileno es tal como se define en la presente memoria.

"Heteroarilenoalquilsulfonilcarbamoilo" significa un grupo heteroarileno-SO₂-NH-CO- en el que el grupo heteroarileno es tal como se define en la presente memoria.

"Hidroalquilo" significa un grupo alquilo, tal como se define en la presente memoria, sustituido con uno o más grupos hidroxilo. Los hidroalquilos preferidos contienen un alquilo inferior. Entre los grupos hidroalquilo representativos se incluyen hidroximetilo y 2-hidroxietilo.

"Grupo enlazante" comprende los átomos que unen el colorante a la biomolécula. Por ejemplo, haciendo referencia a la tabla 1, la columna A es una lista de las funcionalidades reactivas, las cuales pueden encontrarse en el colorante o en la biomolécula. La columna B es una lista de los grupos complementarios, ya sea en la biomolécula o en el colorante (preferentemente, una funcionalidad carboxilo, hidroxilo, tiol o amino), que, junto con las funcionalidades reactivas, forman el enlace resultante de la columna C. El grupo enlazante comprende el enlace resultante y, opcionalmente, los átomos adicionales. Véase también R. Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular probes, Inc. (1992). En un aspecto, R¹⁸ representa un grupo enlazante antes de que ocurra la reacción de unión, y R³⁰ representa la unión resultante entre el colorante y la biomolécula. Entre los grupos enlazantes preferidos se incluyen grupos fosforamida, éster de NHS, ácido carboxílico activado, tiocianato, isotiocianato, maleimida y yodoacetamida. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido carboxílico activado" es un derivado de un grupo carboxilo que es más susceptible al ataque nucleófilo que un grupo carboxilo libre; por ejemplo, anhídridos de ácido, tioésteres, haluros de acilo, éster de NHS y ésteres de sulfo-NHS.

"Oxo" significa un grupo de fórmula >C=O (es decir, un grupo carbonilo).

"Fosforamiditilo" significa un átomo de fósforo trivalente unido a dos grupos -OR y un átomo de nitrógeno, en el que el nitrógeno está opcionalmente sustituido.

"Sustituyentes de sistema de anillo" significa sustituyentes unidos a sistemas de anillo aromáticos o no aromáticos, incluidos hidrógeno, alquilo, arilo, heteroarilo, aralquilo, aralqueno, aralquino, heteroaralquilo, heteroaralqueno, heteroaralquino, hidroxilo, hidroalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, acilo, aroilo, halo, nitro, ciano, carboxilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, aralcoxycarbonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, heteroarilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, carboxialquilo, heteroarilsulfonilo, alquiltio, ariltio, nitrilo, NO₂ heteroariltio, aralquiltio, heteroaralquiltio, cicloalquilo, cicloalqueno, heterociclilo, heterociclenilo, arildiazo, heteroarildiazo, amidino y similares.

"Sulfonato" es un grupo SO₃⁻, preferentemente unido a un catión.

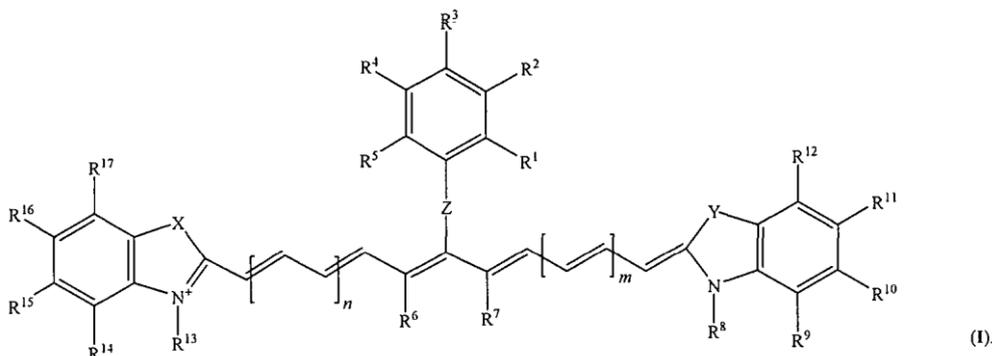
"Colorante sulfo-fenoxi" es un colorante cianina en el que el puente no saturado del colorante cianina está sustituido con un enlace éter a un anillo de benceno sustituido con un grupo sulfonato, preferentemente en la posición 4 del anillo de benceno.

Todos los demás acrónimos y abreviaturas tienen el significado correspondiente según lo publicado en revistas

sobre la técnica de la química orgánica.

II. Colorantes cianina

5 En un aspecto, se da a conocer un colorante cianina de fórmula (I):



10 Preferentemente, Z es un heteroátomo que tiene, por lo menos, un par solitario de electrones. En un aspecto particular, Z es O, S o NR³⁵, donde R³⁵ es H o alquilo. Si R³⁵ es alquilo, R³⁵ es preferentemente un alquilo inferior. Preferentemente, Z tiene una estructura tal que sólo un átomo se encuentra en el enlace directo entre el anillo de benceno unido a Z y a la cadena de polieno de fórmula —CH=CH— unido a Z. Es aceptable la presencia de cadenas laterales en el enlace entre el anillo de benceno y la cadena de polieno. En las formas de realización que tienen cadenas laterales, son preferidas las cadenas laterales de alquilo inferior.

15 R¹-R⁵ son, cada uno independientemente, H, alquilo, halo, carboxilo, amino o SO₃⁻Cat⁺, donde Cat⁺ es un catión y, por lo menos, uno de entre R¹-R⁵ es SO₃⁻Cat⁺. Preferentemente, R³ es SO₃⁻Cat⁺. De forma particularmente preferida, Cat⁺ es H⁺ o un ion de metal alcalino, tal como Na⁺.

20 R⁶ y R⁷ son, cada uno, H, alquilo, o forman opcionalmente un anillo junto con el grupo —CH=CH— al que están unidos. Preferentemente, R⁶ y R⁷, junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo. Preferentemente, el anillo tiene de 4 a 10 átomos miembro, más preferentemente 5 o 6 átomos miembro. En un aspecto, preferentemente, el anillo que incluye R⁶ y R⁷ está sustituido, preferentemente con un radical sulfonato.

25 Los números enteros m y n son, cada uno independientemente, números enteros comprendidos entre 0 y 5. Preferentemente, tanto m como n son dos. Más preferentemente, tanto m como n son uno. Todavía más preferentemente, tanto m como n son cero. A medida que aumentan m y n, aumenta también la longitud de onda del colorante. En general, la adición de cada doble enlace en la cadena de polieno puede aumentar la longitud de onda en un valor comprendido entre 40 nm y 120 nm. Para los cambios de absorción acompañados con trimetino a pentametino, o pentametino a heptametino, hay típicamente un desplazamiento batocrómico (desplazamiento hacia el rojo) de aproximadamente 100 nm. Por ejemplo, cuando m y n son 0, la longitud de onda del colorante preferido es de aproximadamente 770 nm. Cuando m y n son 1, la longitud de onda del colorante preferido es de aproximadamente 950 nm. Los colorantes más preferidos operan en el espectro IR cercano (600-1.000 nm).

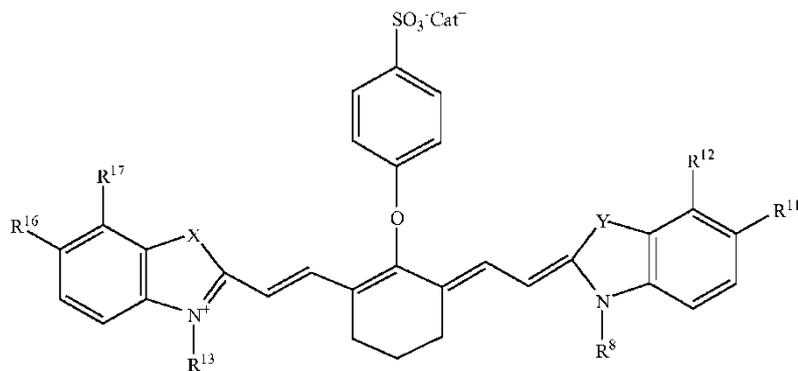
35 X e Y son, cada uno independientemente, O, S, Se o CR¹⁹R²⁰, donde R¹⁹ y R²⁰ son, cada uno independientemente, alquilo, o forman opcionalmente un anillo junto con el átomo de carbono al que están unidos. Preferentemente, X e Y son un heteroátomo, tal como O, S y Se. Cuando X o Y son CR¹⁹R²⁰, R¹⁹ y R²⁰ son, preferentemente, un alquilo inferior, y más preferentemente los dos R¹⁹ y R²⁰ son metilo.

40 R⁸ y R¹³ son, cada uno independientemente, alquilo, (CH₂)_rR²⁵ o (CH₂)_rR¹⁸; donde, por lo menos, uno de entre R⁸ y R¹³ es (CH₂)_rR¹⁸, y donde r es un número entero comprendido entre 1 y 50, y R²⁵ es un grupo funcional no reactivo que no reacciona directamente con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol, y R¹⁸ es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol. En un aspecto, uno de entre R⁸ y R¹³ es (CH₂)_rR¹⁸ y el otro es (CH₂)_rR²⁵. Dicho de otro modo, preferentemente, uno de entre R⁸ y R¹³ reacciona con la biomolécula formando un enlace con la misma y el otro no reacciona. El grupo R¹⁸ debe ser capaz de unirse covalentemente con la biomolécula que se marca. De forma particularmente preferida, los grupos R¹⁸ incluyen mercapto, carboxilo, amino, haloalquilo, fosforamiditilo, éster de N-hidroxisuccinimidilo, éster de sulfo-N-hidroxisuccinimidilo, isotiocianato, yodoacetamidilo y maleimidilo. Entre los grupos R²⁵ particularmente preferidos se incluyen hidroxilo, tioacetilo y sulfonato.

50 R⁹-R¹² y R¹⁴-R¹⁷ son, cada uno independientemente, H, alquilo, halo, amino, sulfonato, R²¹COOH, R²¹OR²², R²¹SR²² o R²¹COOR²², donde R²¹ es un enlace o alquilenilo y R²² es alquilo, o R¹¹ y R¹² forman, opcionalmente, junto con los

átomos a los que están unidos, un anillo aromático, o R^{16} y R^{17} forman, opcionalmente, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático. En un aspecto, uno o ambos R^{11} y R^{16} son sulfonato. En otro aspecto, cuando R^{11} y R^{12} , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo aromático, el anillo está sustituido, por lo menos en una posición, con un grupo sulfonato. En otro aspecto, cuando R^{16} y R^{17} , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo aromático, el anillo está sustituido, por lo menos en una posición, con un grupo sulfonato, un grupo halo, un sustituyente alquilo o un sustituyente amino.

En otro aspecto, se da a conocer un colorante cianina de fórmula (V):



(V).

Cat^+ es un catión. Preferentemente, Cat^+ es H^+ o un ion metálico. Más preferentemente, Cat^+ es un ion de metal alcalino, de la forma más preferida Na^+ . X e Y son, cada uno independientemente, O, S, Se o $(CH_3)_2C$.

R^8 y R^{13} son, cada uno independientemente, alquilo, $(CH_2)_r R^{25}$ o $(CH_2)_r R^{18}$, donde, por lo menos, uno de entre R^8 y R^{13} es $(CH_2)_r R^{18}$, y donde r es un número entero comprendido entre 1 y 50, y R^{25} es un grupo funcional que no reacciona directamente con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol, y R^{18} es un grupo funcional que puede reaccionar con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol. En un aspecto, uno de entre R^8 y R^{13} es $(CH_2)_r R^{18}$ y el otro es $(CH_2)_r R^{25}$. Dicho de otro modo, preferentemente, uno de entre R^8 y R^{13} reacciona con la biomolécula formando un enlace con la misma y el otro no reacciona. El grupo R^{18} debe ser capaz de unirse covalentemente con la biomolécula que se marca. De forma particularmente preferida, los grupos R^{18} incluyen mercapto, carboxilo, amino, haloalquilo, fosoramidilo, éster de N-hidroxisuccinimidilo, éster de sulfo-N-hidroxisuccinimidilo, isotiocianato, yodoacetamidilo y maleimidilo. Entre los grupos R^{25} particularmente preferidos se incluyen hidroxilo, tioacetilo y sulfonato.

R^{11} y R^{12} son H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático. En una forma de realización preferida, R^{11} es sulfonato. En otro aspecto, cuando R^{11} y R^{12} , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo aromático, el anillo está sustituido, por lo menos en una posición, con un grupo sulfonato.

R^{16} y R^{17} son H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático. En una forma de realización preferida, R^{16} es sulfonato. En otro aspecto, cuando R^{16} y R^{17} , junto con los átomos a los que están unidos, forman un anillo aromático, el anillo está sustituido, por lo menos en una posición, con un grupo sulfonato.

Los colorantes cianina que se dan a conocer pueden ser excitados de manera eficiente por equipos comercialmente disponibles, que pueden adquirirse a través de empresas como LI-COR, Toshiba, Phillips, Blue Sky Research y NEC.

Los colorantes cianina tienen suficiente solubilidad en soluciones acuosas para que, una vez unidos a una biomolécula soluble, la biomolécula mantenga su solubilidad. Los colorantes también tienen una buena solubilidad en medios orgánicos, lo que proporciona una considerable flexibilidad a los enfoques sintéticos al mercado de las biomoléculas deseadas.

Los colorantes cianina aumentan su estabilidad química en presencia de hidróxido de amonio y DTT. Los colorantes cianina tienen una fotoestabilidad y una termoestabilidad mayores que las de los colorantes de fenoxicianina.

III. Preparación de los colorantes cianina

Los colorantes cianina se preparan mediante métodos bien conocidos en la técnica. En términos generales, los colorantes cianina se preparan de acuerdo con los procedimientos descritos en Hamer, F. M., Cyanide Dyes and Related Compounds, Weissberger, Mass., ed. Wiley Interscience, N.Y. 1964. Además, las patentes US nº 4.337.063; 4.404.289 y 4.405.711 describen una síntesis para una variedad de colorantes cianina que tienen grupos éster activos de N-hidroxisuccinimida. La patente US nº 4.981.977 describe una síntesis de colorantes cianina que tienen grupos ácido carboxílico. La patente US nº 5.268.486 da a conocer un método para preparar colorantes cianina de

arilsulfonato. La patente US nº 6.027.709 da a conocer métodos para preparar colorantes cianina que tienen grupos fosforamidita. La patente US nº 6.048.982 da a conocer métodos para preparar colorantes cianina que tienen un grupo reactivo seleccionado entre el grupo que comprende isotiocianato, isocianato, fosforamidita, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina sustituida con monohalógeno o dihalógeno, diazina sustituida con monohalógeno o dihalógeno, aziridina, haluro de sulfonilo, haluro de ácido, éster de hidroxisuccinimida, éster de hidroxisulfosuccinimida, éster de imido, glioxal y aldehído.

Una ruta de síntesis común comprende preparar sales cuaternarias de indolsulfonato sustituido o no sustituido según los procedimientos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se detallan en los ejemplos de la presente memoria. Entre las sales cuaternarias de indol particularmente preferidas se incluyen, entre otras, una sal cuaternaria de indolsulfonato y una sal cuaternaria de bencindol alcohol, que se ilustran en la presente memoria.

A continuación, este par de sales sintetizadas se hace reaccionar con una base de Schiff comercialmente disponible (a través de ALDRICH), tal como monohidrocloreto de N-[(3-(anilino metileno)-2-cloro-1-ciclohexen-1-il)metileno]anilina, utilizando técnicas y condiciones de reacción bien conocidas en la técnica, algunas de las cuales se detallan en los ejemplos de la presente memoria. A continuación, el producto se hace reaccionar con un ácido hidroxibencensulfónico, obteniéndose un colorante según la presente invención. El colorante puede modificarse adicionalmente para obtener otros colorantes según la presente invención, por ejemplo, haciendo reaccionar el colorante con fosforamiditas comercialmente disponibles, tales como tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo, utilizando técnicas y condiciones de reacción bien conocidas en la técnica, algunas de las cuales se detallan en los ejemplos de la presente memoria.

IV. Biomoléculas de marcado

Los colorantes cianina se pueden unir a las biomoléculas, que se han definido anteriormente. A través de grupos enlazantes, el colorante cianina se puede enlazar a la biomolécula, por ejemplo, utilizando la química de la fosforamidita, formando, en última instancia, un enlace fosfato entre el colorante y la biomolécula. Para ver ejemplos de dichos métodos de marcado, véase la patente US nº 6.027.709, que da a conocer muchos grupos enlazantes preferidos, métodos de unión y biomoléculas que pueden marcarse fácilmente. Preferentemente, en general, se prepara una fosforamidita de un colorante cianina para marcar moléculas de ADN en una máquina de síntesis de ADN. Preferentemente, el colorante se une al extremo 5' de un oligonucleótido protegido, unido a un soporte, mediante la química estándar de la fosforamidita. La síntesis en una escala de 200 nmol produce habitualmente rendimientos en bruto de oligonucleótidos marcados con colorante de 50-60 nmol.

Muchos métodos de unión de colorantes a diversos tipos de biomoléculas son bien conocidos en la técnica. Para una síntesis completa de los procedimientos de marcado de oligonucleótidos, véase R. Haugland en Excited States of Biopolymers, Steiner ed., Plenum Press (1983), Fluorogenic Probe Design and Synthesis: A Technical Guide, PE Applied Biosystems (1996), y G. T. Herman, Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996).

Preferentemente, el marcado de anticuerpos se lleva a cabo en un tampón, que incluye, opcionalmente, un codisolvente orgánico, en condiciones de pH básico y a temperatura ambiente. También preferentemente, el anticuerpo marcado se purifica mediante cromatografía de permeación en gel, utilizando equipos como una columna de SEPHADEX G-50 para eliminar el colorante no conjugado, o mediante diálisis. Los expertos en la técnica conocerán otras vías y medios para la purificación.

En un aspecto, se da a conocer un método de marcado de una biomolécula, en el que el grupo R¹⁸ de cualquiera entre el grupo R⁸ o el grupo R¹³ del colorante cianina reacciona con un tiol, un hidroxilo, un carboxilo o un grupo amino de una biomolécula, formando una unión (R³⁰) entre el colorante y la biomolécula. Habitualmente, esta reacción se lleva a cabo en mezclas de tampón acuoso y un disolvente orgánico, tal como DMF, a un pH de entre 8 y 9. En una forma de realización preferida, utilizando la química de la fosforamidita, es preferida la síntesis en fase sólida, tal como se da a conocer en la patente US nº 6.027.709.

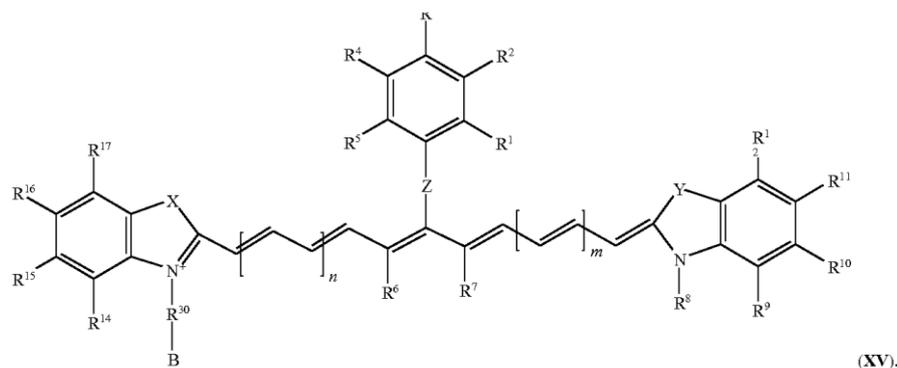
Las biomoléculas pueden marcarse utilizando un kit. En una forma de realización preferida de un kit, el mismo comprende un colorante de fórmula (I) o (V) y un tampón. Preferentemente, el kit contiene un tampón de acoplamiento, tal como KH₂PO₄ 1 M (pH 7,0). Preferentemente, el tampón tiene un fondo de baja fluorescencia.

Opcionalmente, el kit puede contener un subkit de purificación. Tras marcar una biomolécula con uno de los colorantes, la biomolécula marcada puede separarse de cualquier producto de reacciones secundarias y de cualquier producto hidrolizado libre resultante de la hidrólisis normal. Para biomoléculas que contienen 13 aminoácidos o menos, la cromatografía en capa fina preparativa (TLC) puede eliminar las impurezas. Invitrogen suministra un kit de purificación de péptidos TLC especialmente diseñado para purificar péptidos o proteínas marcados con colorante.

Para biomoléculas más grandes, tales como péptidos o proteínas más grandes, una resina SEPHADEX G-15 o G-25 puede eliminar los derivados no deseados. Invitrogen suministra un kit de filtración en gel de proteínas diseñado para separar péptidos y proteínas marcados con colorante del colorante libre. A menudo, las biomoléculas marcadas

con colorante que permanecen tras la desalación se pueden utilizar con éxito sin más purificación. En algunos casos, puede ser necesario resolver y evaluar la actividad de los diferentes productos de colorante mediante HPLC u otras técnicas cromatográficas.

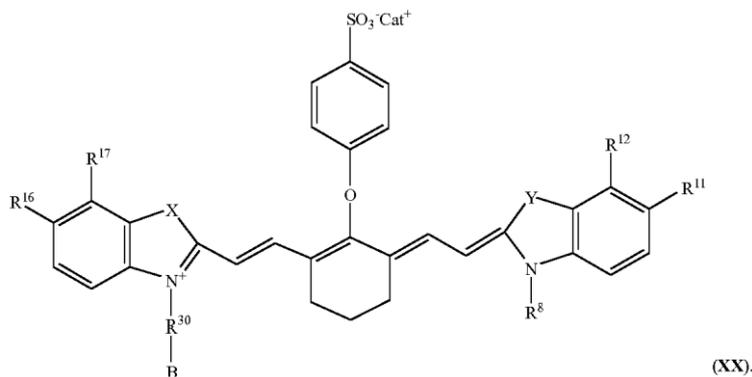
- 5 Una vez marcada, una biomolécula marcada con colorante tal como se da a conocer presenta la siguiente fórmula (XV):



- 10 Todos los sustituyentes son tal como se han definido anteriormente. B es una biomolécula y R^{30} es $(CH_2)_rL$, donde r es un número entero comprendido entre 1 y 50, y L es un grupo enlazante. Preferentemente, B es una proteína, un péptido, un sustrato de enzima, una hormona, un anticuerpo, un antígeno, un hapteno, una avidina, una estreptavidina, un carbohidrato, un oligosacárido, un polisacárido, un ácido nucleico, un ácido desoxinucleico, un fragmento de ADN, un fragmento de ARN, trifosfatos de nucleótidos, trifosfatos de terminadores aciclo y PNA. Para una lista de terminadores de marcado preferidos para su utilización en la secuenciación de ADN, véase la patente US nº 5.332.666.

- 15 Preferentemente, r está comprendido entre 1 y 5. Preferentemente, L es fosoramiditilo u otro grupo enlazante, algunos de los cuales se ilustran en la patente de Estados Unidos nº 6.027.709. En un aspecto, L es un éster difosfato de amidita.
- 20

En otro aspecto, la biomolécula marcada con colorante presenta la fórmula (XX):



- 25 Todos los sustituyentes son tal como se han definido anteriormente. B es una biomolécula y R^{30} es $(CH_2)_rL$, donde r es un número entero comprendido entre 1 y 50, y L es un grupo enlazante. Preferentemente, r está comprendido entre 1 y 5. En una forma de realización preferida, cuando se forma la unión, L es un diéster de fosfato. En la patente US nº 6.027.709 se dan a conocer ejemplos de biomoléculas marcadas con colorante similares.

30 Secuenciación de ADN

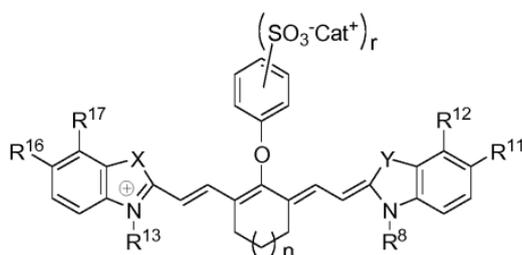
- Las biomoléculas marcadas con colorante se pueden utilizar en aplicaciones biológicas, tales como secuenciación de ADN. La biomolécula marcada, tal como un oligonucleótido, se puede utilizar, por ejemplo, como cebador en el método de secuenciación de ADN de Sanger, como cebador con cola para genotipado o como sonda de hibridación. Algunas técnicas y condiciones de reacción bien conocidas para la secuenciación de ADN se detallan en los ejemplos de la presente memoria.

- 40 Se describen métodos bien conocidos de secuenciación del ADN, que incluyen el método de degradación química de Maxam-Gilbert, en Maxam y otros, Met. in Enzym. 65:499 (1980), y la técnica de terminación de cadena didesoxi

de Sanger, descrita en Sanger y otros, P.N.A.S. USA 74:5463 (1977). En cada método, se generan fragmentos de ADN marcados con ^{32}P que se analizan por electroforesis en gel. El fósforo radiomarcado ya no suele utilizarse en estos métodos, ya que ha sido reemplazado por los colorantes.

- 5 La secuenciación del ADN también se describe en artículos de publicaciones. Véase, por ejemplo, Middendorf, L. R., Humphrey, P. G., Narayanan, N., y Roemer, R. C. "Sequencing Technology" en: *Biotechnology*. Rehm, H.-J. and Reed, G. (editores), Wiley-VCH Publishers, Alemania (capítulo presentado); B. Barrell, *The FASEB Journal*, 5, 40 (1991); y G. L. Trainor, *Anal. Chem.* 62, 418 (1990), y las referencias citadas en los mismos. El procedimiento químico de secuenciación de ADN más ampliamente utilizado es el método enzimático de terminación de la cadena de Sanger, mencionado anteriormente, que ha sido adoptado por varias estrategias de secuenciación diferentes. Las reacciones de secuenciación se llevan a cabo en solución utilizando diferentes ADN polimerasas, tales como la ADN polimerasa Taq de termófila [M. A. Innes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9436 (1988)] o la ADN polimerasa T7 especialmente modificada ("SEQUENASE") [S. Tabor y C. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4767 (1987)], o en combinación con la utilización de soportes poliméricos. Véase, por ejemplo, S. Stahl y otros, *Nucleic Acids Res.*, 16, 3025 (1988); M. Uhlen, solicitud PCT WO 89/09282; Cocuzza y otros, solicitud PCT WO 91/11533; y Jones y otros, solicitud PCT WO 92/03575.

En algunos aspectos, la presente divulgación da a conocer un compuesto de fórmula XXI:



- 20 donde Cat^+ es un catión; r es un número entero igual a 1, 2 o 3; X e Y son, cada uno independientemente, O, S, Se o $(\text{CH}_3)_2\text{C}$; y R^8 y R^{13} son, cada uno independientemente, alquilo, L- R^{25} o L- R^{18} ; donde, por lo menos, uno de entre R^8 y R^{13} es L-B; R^{25} es un grupo funcional no reactivo que no reacciona directamente con un grupo carboxilo, hidroxilo, amino o tiol; L es un conector; B es un ligando; n es 0, 1, 2 o 3; R^{11} y R^{12} son, cada uno independientemente, F, H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático; y R^{16} y R^{17} son, cada uno independientemente, F, H, sulfonato o forman, junto con los átomos a los que están unidos, un anillo aromático. Preferentemente, X e Y son $(\text{CH}_3)_2\text{C}$. Preferentemente, r es 1.

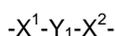
- 25 Una amplia gama de grupos funcionales no reactivos son adecuados para R^{25} . Entre los grupos adecuados se incluyen, por ejemplo, hidroxilo, tioacetilo, sulfonato, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, carboxilo no activado opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido y heterociclilo opcionalmente sustituido, sulfatos opcionalmente sustituidos, fosfatos opcionalmente sustituidos y de sales de amonio opcionalmente sustituidas.

- 30 En algunos aspectos, R^{11} y R^{12} son, cada uno independientemente, F, H, o sulfonato; R^{16} y R^{17} son, cada uno independientemente, F, H, o sulfonato; y n es 1. Preferentemente, Cat^+ es H^+ o un ion metálico. En algunos aspectos, por lo menos uno de entre X e Y es $(\text{CH}_3)_2\text{C}$. Para alcanzar la neutralidad de carga, el experto en la materia entenderá que, tras el primer grupo "sulfonato" adicional de R^{11} , R^{12} , R^{16} y R^{17} , se añade un Cat^+ . El primer grupo "sulfonato" se neutraliza con el nitrógeno cuaternario. r es preferentemente igual a 1.

- 35 En algunos aspectos, L es un miembro seleccionado entre el grupo que comprende un enlace directo o un enlace covalente, en el que el enlace covalente es lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 60 átomos seleccionados entre el grupo que comprende C, N, P, O y S, en el que L puede tener átomos de hidrógeno adicionales para cubrir valencias, en el que el enlace contiene cualquier combinación de enlaces éter, tioéter, amina, éster, carbamato, urea, tiourea, oxi o amida; o enlaces carbono-carbono simples, dobles, triples o aromáticos; o enlaces fósforo-oxígeno, fósforo-azufre, nitrógeno-nitrógeno, nitrógeno-oxígeno o nitrógeno-platino; o enlaces aromáticos o heteroaromáticos.

- 40 En otros aspectos, L es un miembro seleccionado dentro del grupo que comprende un PEG, un copolímero de bloque de PEG-poliuretano y un PEG-polipropileno. En otros aspectos, L es un miembro seleccionado dentro del grupo que comprende un polisacárido, un polipéptido, un oligosacárido, un polímero, un copolímero y un oligonucleótido.

- 55 En algunos aspectos, L presenta la fórmula:

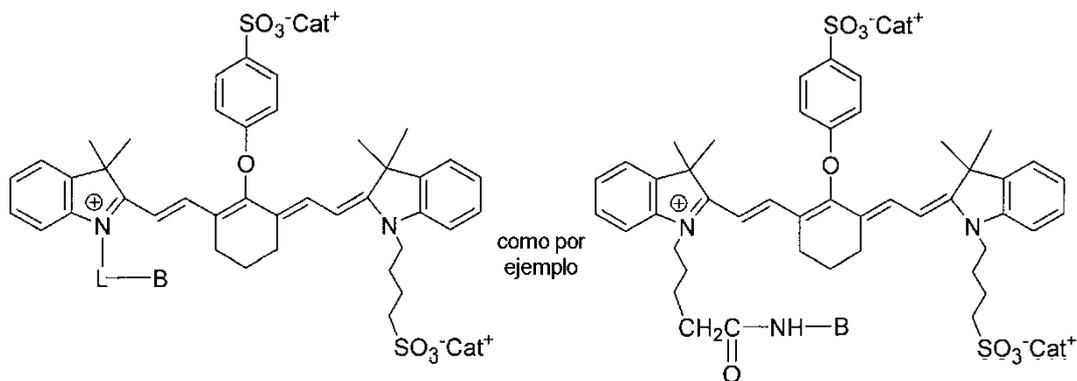


en la que: X^1 es un miembro seleccionado dentro del grupo que comprende un radical bivalente, un enlace directo, oxígeno, un nitrógeno opcionalmente sustituido y azufre; Y_1 es un miembro seleccionado dentro del grupo que comprende un enlace directo y alquileo C_1 - C_{10} opcionalmente interrumpido por un heteroátomo; y X^2 es un miembro seleccionado dentro del grupo que comprende un radical bivalente, un enlace directo, oxígeno, un nitrógeno opcionalmente sustituido y azufre.

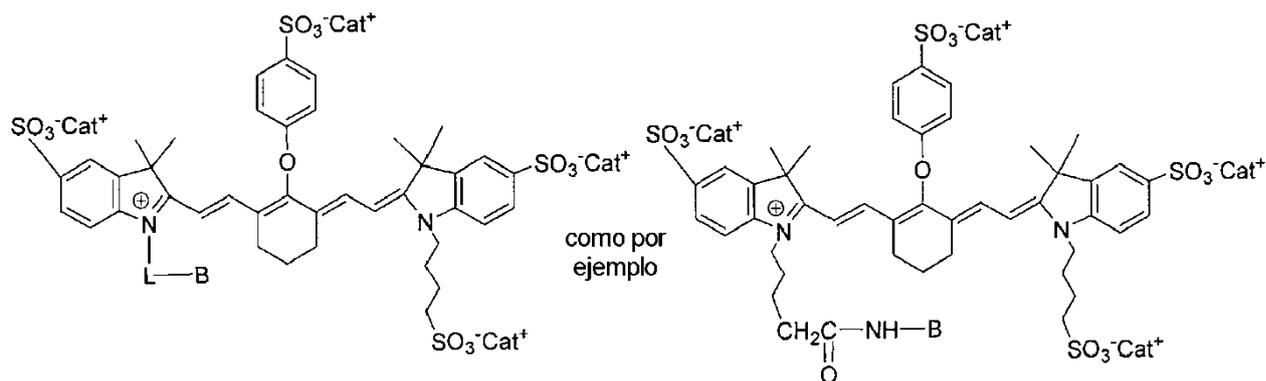
En algunos aspectos, el radical bivalente de X^1 y X^2 se seleccionan, cada uno independientemente, del grupo que comprende un enlace directo, alquileo opcionalmente sustituido, alquilenoxicarbonilo opcionalmente sustituido, alquilenocarbamoilo opcionalmente sustituido, alquilenosulfonilo opcionalmente sustituido, alquilenosulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, arilenosulfonilo opcionalmente sustituido, arilenoxicarbonilo opcionalmente sustituido, arilenocarbamoilo opcionalmente sustituido, arilenosulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido, carbamoilo opcionalmente sustituido, carbonilo opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, heteroarilenoxicarbonilo opcionalmente sustituido, heteroarilenocarbamoilo opcionalmente sustituido, heteroarilensulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, sulfonilcarbamoilo opcionalmente sustituido, tiocarbonilo opcionalmente sustituido, un sulfonilo opcionalmente sustituido, y sulfinilo opcionalmente sustituido.

En algunos aspectos, L es $-(CH_2)_r-$, donde r es un número entero de 1 a 50. Por ejemplo, R^8 y R^{13} son $(CH_2)_rB$, donde r es un número entero de 1 a 5. En algunos aspectos, R^{25} es un grupo alquilo opcionalmente sustituido.

En algunos aspectos, el compuesto tiene la siguiente estructura:

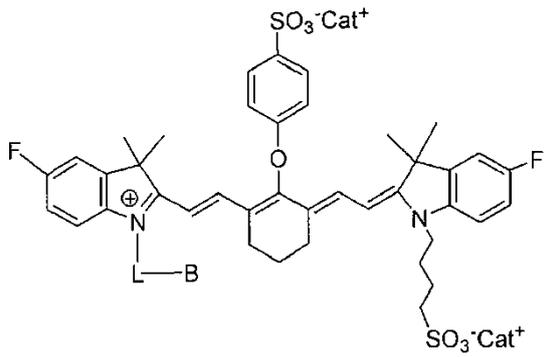


o la siguiente estructura:

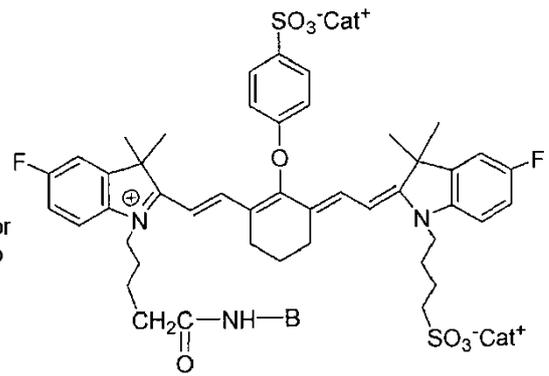


o

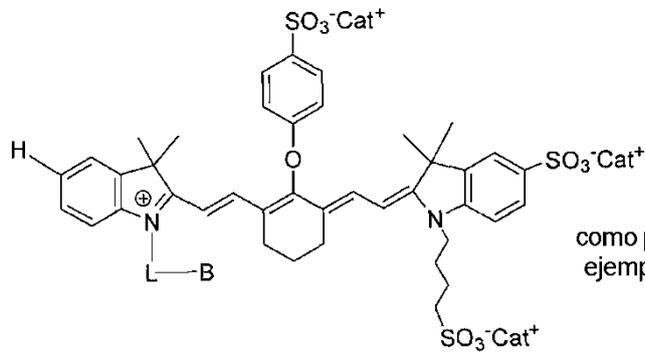
30



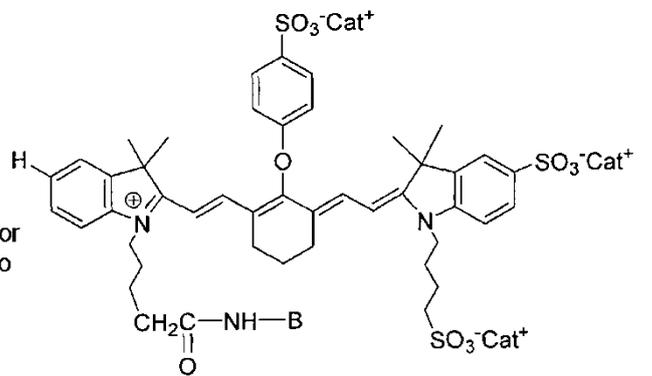
como por ejemplo



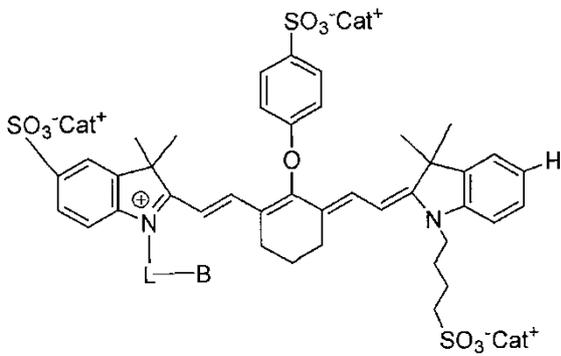
o



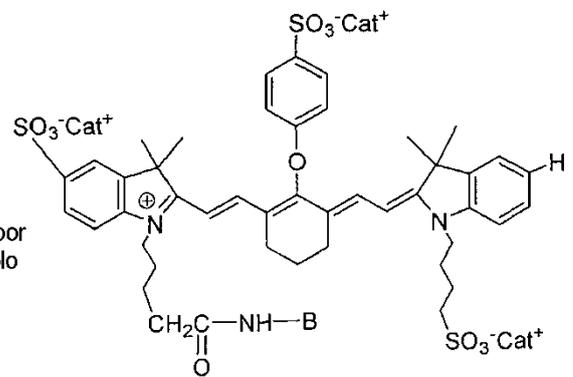
como por ejemplo



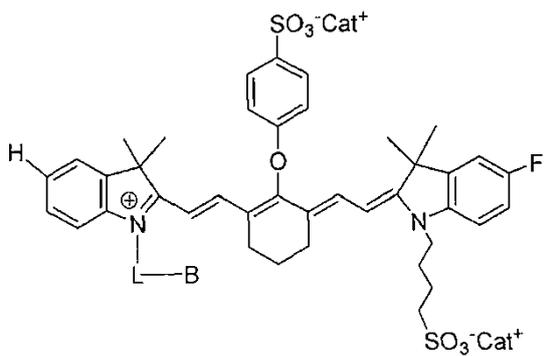
o



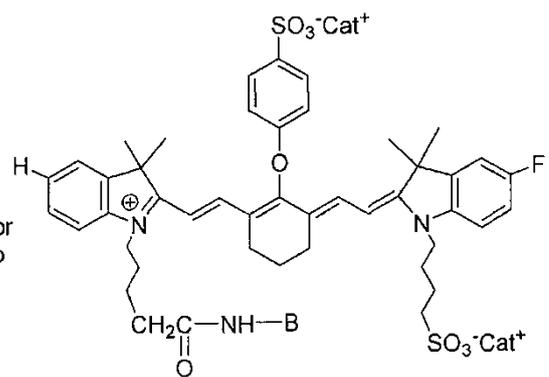
como por ejemplo

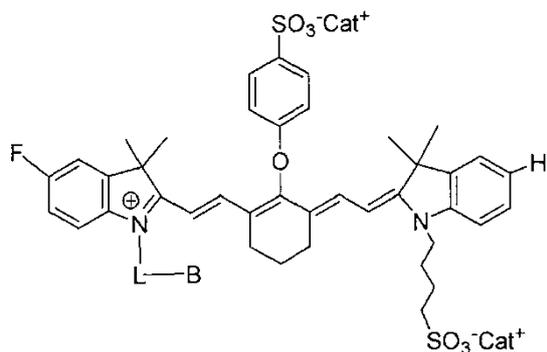


o

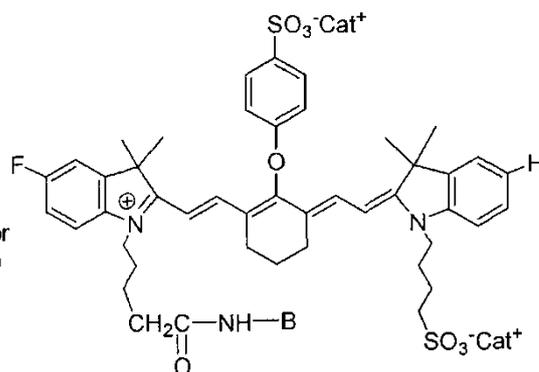


como por ejemplo

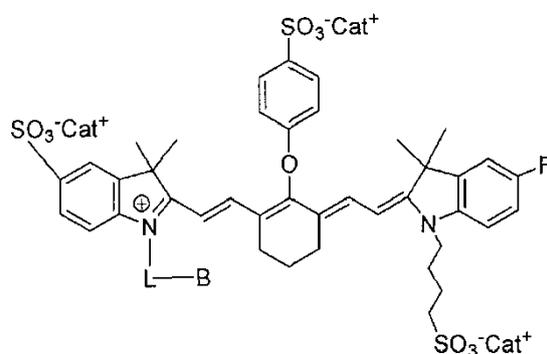




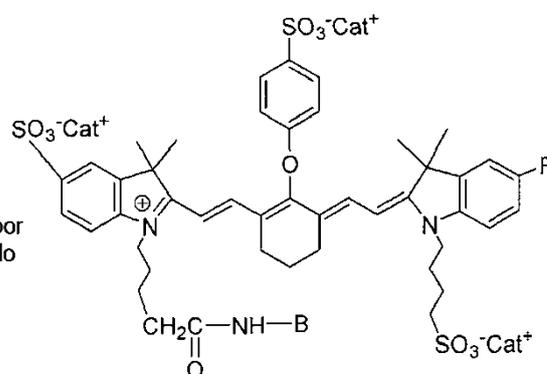
como por ejemplo



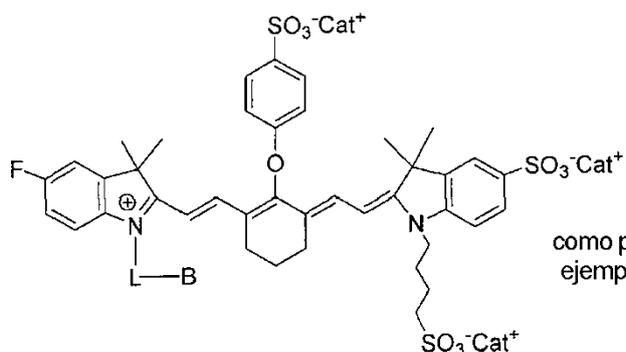
5



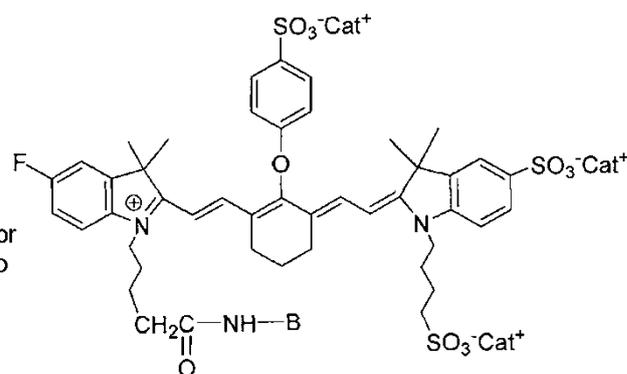
como por ejemplo



o



como por ejemplo



10

En algunos aspectos, B es un ligando que tiene afinidad por un receptor seleccionado entre el grupo que comprende EGFR, Her2, PDGFR, IGFR, c-Ryk, c-Kit, CD24, integrinas, FGFR, KFGFR, VEGFR, receptores señuelo de TRAIL, receptor de retinoides, receptor de factores de crecimiento, PPAR, receptor de vitaminas, receptor de glucocorticosteroides, receptor X de retinoides, RHAMM, receptores de folato de alta afinidad, receptor Met, receptor de estrógenos y Ki67.

15

Alternativamente, B se selecciona entre el grupo de somatostatinas, endostatinas, un carbohidrato, un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido, aptámeros, liposomas y PEG.

20

En otros aspectos, B es 2-desoxi-D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosamina, un derivado de glucosa, gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrolosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa y tagatosa.

25

En otros aspectos, B se selecciona entre el grupo de angiopoyetinas, angiostatina, angiotensina II, α 2-antiplasmina, anexina V, tetradecasulfato de β -ciclodextrina, endoglina, endosialina, endostatina, factor de crecimiento epidérmico, fibrina, fibrinopéptido β , factor de crecimiento de fibroblastos, FGF-3, fibronectina básica, heparina, fumagilina, factor de crecimiento de hepatocitos, hialuronano, factores de crecimiento insulinoideos, inhibidores de interferón α, β ,

5 inhibidores de IL, laminina, factor inhibidor de leucemia, linomida, metaloproteinasa de matriz 2, metaloproteinasas, inhibidores de metaloproteinasas, anticuerpos o fragmentos, anticuerpos monoclonales o fragmentos, RGD_D FV cíclico, factor de crecimiento placentario, proteína relacionada con la proliferina placentaria, plasminógeno, activador del plasminógeno, inhibidor de activador de plasminógeno 1, antagonistas del factor activador de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, pleyotropina, proliferina, proteína relacionada con la proliferina, selectinas: selectina E, SPARC, venenos de serpiente, sustancia P, suramina, inhibidor tisular de las metaloproteinasas, talidomida, trombina, tetradecapéptido activador de receptor de trombina, factor de crecimiento transformante α,β , receptor del factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento tumoral α , factor de necrosis tumoral, vitronectina, avidina y estreptavidina.

10 En algunos aspectos, B es el factor de crecimiento epidérmico. En otros aspectos, B es un resto que tiene afinidad por el hueso o puede incorporarse al mismo, tal como calceína y derivados de calceína.

15 En la tabla 1 se muestran ejemplos seleccionados de funcionalidades reactivas útiles para la fijación del colorante al ligando o biomolécula, donde el enlace resulta de la reacción de un colorante con un ligando o biomolécula. Los expertos en la materia conocerán otros enlaces adecuados para su utilización.

20 Tabla 1

A Funcionalidad reactiva (sobre colorante o biomolécula).	B Grupo complementario (sobre biomolécula o colorante).	C Enlace resultante (por ejemplo, R ³⁰)
ésteres activados *	aminas/anilinas	carboxamidas
acrilamidas	tioles	tioéteres
azidas de acilo**	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de acilo	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de acilo	alcoholes/fenoles	ésteres
acil nitrilos	alcoholes/fenoles	ésteres
acil nitrilos	aminas/anilinas	carboxamidas
aldehídos	aminas/anilinas	iminas
aldehídos o cetonas	hidrazinas	hidrazonas
aldehídos o cetonas	hidroxilaminas	oximas
haluros de alquilo	aminas/anilinas	alquil aminas
haluros de alquilo	ácidos carboxílicos	ésteres
haluros de alquilo	tioles	tioéteres
haluros de alquilo	alcoholes/fenoles	éteres
anhídridos	alcoholes/fenoles	ésteres
anhídridos	aminas/anilinas	carboxamidas/imidas
haluros de arilo	tioles	tiofenoles
haluros de arilo	aminas	aril aminas
aziridinas	tioles	tioéteres
boronatos	glicoles	ésteres de boronato
ácidos carboxílicos activados	aminas/anilinas	carboxamidas
ácidos carboxílicos activados	alcoholes	ésteres
ácidos carboxílicos activados	hidrazinas	hidrazidas
carbodiimidas	ácidos carboxílicos	n-acilureas o anhídridos
dialcoanos	ácidos carboxílicos	ésteres
epóxidos	tioles (aminas)	tioéteres (alquil aminas)
epóxidos	ácidos carboxílicos	ésteres
haloacetamidas	tioles	tioéteres
haloplatinato	amino	complejo de platino
haloplatinato	heterociclo	complejo de platino
halotriazinas	aminas/anilinas	aminotriazinas
halotriazinas	alcoholes/fenoles	éteres de triazinilo
imido ésteres	aminas/anilinas	amidinas
isocianatos	aminas/anilinas	ureas
isocianatos	alcoholes/fenoles	uretanos
isotiocianatos	aminas/anilinas	tioureas
maleimidas	tioles	tioéteres
fosforamiditas	alcoholes	ésteres de fosfito

haluros de sililo	alcoholes	éteres de sililo
ésteres de sulfonato	aminas/anilinas	alquil aminas
haluros de sulfonilo	aminas/anilinas	sulfonamidas

* Los ésteres activados, tal como se entiende en la técnica, presentan generalmente la fórmula -COM, donde M es un buen grupo saliente (por ejemplo, succinimidiloxi (-OC₄H₄O₂), sulfosuccinimidiloxi (-OC₄H₃O₂SO₃H), -1-oxibenzotriazolil (-OC₆H₄N₃); 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorofenilo; o un grupo arilo o ariloxi sustituido una o más veces por sustituyentes aceptores de electrones, tales como nitro, fluoro, cloro, ciano o trifluorometilo, o combinaciones de los mismos, que se utilizan para formar ésteres de arilo activados; o un ácido carboxílico activado por una carbodiimida para formar un anhídrido o anhídrido mixto -OCOR^a o OCNR^aNHR^b, donde R^a y R^b, que pueden ser iguales o diferentes, son alquilo C₁-C₆, perfluoroalquilo C₁-C₆ o alcoxi C₁-C₆; o ciclohexilo, 3-dimetilaminopropilo o N-morfolinoetilo).** Las azidas de acilo también pueden reorganizarse en isocianatos.

5 Cuando se enlaza un colorante que tiene un ácido carboxílico con un ligando o biomolécula que contiene amina, el ácido carboxílico del colorante se puede convertir primero en una forma más reactiva con un reactivo de activación, a fin de formar, por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) o un anhídrido mixto. El ligando o biomolécula que contiene amina se trata con el ácido activado resultante, formándose un enlace amida. Habitualmente, esta reacción se lleva a cabo en tampón acuoso con un codisolvente opcional con DMSO o DMF a un pH de entre 8 y 9.

10 De modo similar, la unión de un colorante que contiene isotiocianato es análoga al procedimiento para el colorante carboxílico, pero no es necesaria ninguna etapa de activación. El ligando o biomolécula que contiene amina se trata directamente con el colorante NCS para formar un enlace tiourea. Habitualmente, la reacción se lleva a cabo en tampón acuoso con un codisolvente opcional con DMSO o DMF a un pH de entre 9 y 10.

15 Si el compuesto colorante tiene un grupo hidroxilo reactivo, se puede unir a un ligando o biomolécula, tal como ADN o ARN, a través de la química de la fosforamidita. La utilización de fosforamidita permite el marcado del ADN o ARN durante el proceso de síntesis. El nucleótido protegido se marca mientras está unido a un soporte en fase sólida. El grupo 5'-OH libre se hace reaccionar con la fosforamidita y un activador de tetrazol para formar un enlace fosfito, que posteriormente se oxida a fosfato. A continuación, el ADN o ARN marcado se separa de la fase sólida utilizando amoníaco u otro procedimiento estandarizado.

20 En un aspecto, los colorantes tienen suficiente solubilidad en soluciones acuosas para que, una vez unidos a un ligando o biomolécula soluble, el ligando o biomolécula mantenga su solubilidad. También tienen una buena solubilidad en medios orgánicos (por ejemplo, DMSO o DMF), lo que proporciona una considerable flexibilidad a los enfoques sintéticos al marcado de los materiales deseados.

25 En un aspecto, la presente divulgación da a conocer un método o procedimiento para preparar un ligando o biomolécula marcados con colorante, comprendiendo dicho procedimiento: poner en contacto un ligando o biomolécula con un compuesto de fórmula la para generar el compuesto de fórmula lf.

30 Según la presente divulgación, las biomoléculas pueden marcarse utilizando un kit. En un aspecto, dicho kit comprende un compuesto de fórmula l e instrucciones de uso. En otro aspecto, el kit comprende, además, un tampón. En otro aspecto, el kit contiene un tampón de acoplamiento, tal como NaHCO₃/Na₂CO₃ 0,2 M. En otro aspecto, el tampón tiene un fondo de baja fluorescencia.

35 En algunos aspectos, el enlace covalente entre L y B se selecciona entre el grupo que comprende un enlace directo, un enlace amida, un enlace éster, un enlace éter, un enlace oxima, un enlace éster de fosfato, un enlace sulfonamida, un enlace tioéter, un enlace tiourea y un enlace urea.

V. Aplicaciones adicionales

40 En otros aspectos, los compuestos colorantes se utilizan como agentes de formación de imágenes ópticas in vivo de tejidos y órganos en diversas aplicaciones biomédicas, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, formación de imágenes por tomografía de órganos, monitorización de funciones de órganos, angiografía coronaria, endoscopia de fluorescencia, formación de imágenes de tumores, intervenciones quirúrgicas guiadas por láser, métodos fotoacústicos y de sonofluorescencia, y similares. En un aspecto, los compuestos colorantes son útiles para la
45 detección de la presencia de tumores y otras alteraciones mediante el control del perfil de eliminación del colorante en la sangre. En otro aspecto, los compuestos colorantes son útiles para las intervenciones quirúrgicas guiadas asistidas por láser para la detección de micrometástasis de tumores por laparoscopia. En otro aspecto, los compuestos colorantes son útiles en el diagnóstico de placas ateroscleróticas y coágulos sanguíneos.

50 En otros aspectos, los compuestos colorantes se utilizan en la formación de imágenes de: (1) enfermedades oculares en oftalmología, por ejemplo, para mejorar la visualización de enfermedades coriorretinianas, tales como trastornos vasculares, retinopatías, neovascularización y tumores mediante formación directa de imágenes microscópicas; (2) enfermedades de la piel, tales como tumores de la piel, mediante la formación directa de imágenes microscópicas; (3) enfermedades o tumores gastrointestinales, bucales, bronquiales, cervicales y urinarios

mediante endoscopia; (4) placas ateroscleróticas y otras alteraciones vasculares a través de catéteres endoscópicos flexibles; (5) tumores de mama mediante reconstrucción de imágenes bi o tridimensionales; y (6) tumores cerebrales, perfusión y accidente cerebrovascular mediante reconstrucción de imágenes bi o tridimensionales.

5 Los compuestos que son conjugados de colorantes son particularmente útiles para la obtención de imágenes de tumores, tejidos y órganos en un sujeto. Por ejemplo, la existencia de células cancerosas o tejidos cancerosos se puede verificar mediante el marcado de un anticuerpo antitumoral con un compuesto colorante y posterior administración del anticuerpo conjugado con colorante al sujeto para la detección y la formación de imágenes del tumor. Los conjugados entre el compuesto colorante y otros anticuerpos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ligandos
10 para receptores de la superficie celular, moléculas pequeñas y similares también son agentes útiles para la formación de imágenes in vivo de tumores, tejidos y órganos en un sujeto.

Los compuestos pueden administrarse sistémica o localmente al órgano o tejido del que se quieren obtener imágenes antes del procedimiento de formación de imágenes. En un aspecto, los compuestos se administran por vía intravenosa. En otro aspecto, los compuestos se administran por vía parenteral. En otro aspecto, los compuestos se administran por vía enteral. Habitualmente, las composiciones utilizadas para la administración del compuesto contienen una cantidad eficaz del compuesto colorante o conjugado de colorante junto con vehículos y excipientes farmacéuticos convencionales adecuados para el tipo de administración contemplada. Por ejemplo, las formulaciones parenterales contienen, ventajosamente, una solución o suspensión acuosa estéril del compuesto colorante o conjugado de colorante según la presente invención. Habitualmente, las composiciones para la administración enteral contienen una cantidad eficaz del colorante en solución o suspensión acuosa, que pueden incluir opcionalmente tampones, tensioactivos, agentes tixotrópicos, agentes aromatizantes y similares.

Las composiciones se administran en dosis eficaces para obtener la imagen óptica deseada de un tumor, tejido u órgano. Dichas dosis pueden variar ampliamente, dependiendo del compuesto colorante o conjugado de colorante utilizado en concreto, del tumor, tejido u órgano sometidos al procedimiento de formación de imágenes, del equipo de formación de imágenes utilizado y similares.

En el procedimiento de la presente divulgación, se da a conocer la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto colorante; un agente de direccionamiento, tal como un conjugado de colorante; o mezclas de los mismos. En un aspecto, el agente de direccionamiento se une selectivamente al tejido diana. A continuación, se administra luz a una longitud de onda o banda de onda que corresponde a la que es absorbida por el agente fotosensibilizante. En otro aspecto, los compuestos actúan como agentes capaces de unirse a uno o más tipos de células o tejidos diana y que, cuando se exponen a la luz de una banda de onda adecuada, absorben la luz, haciendo que se produzcan sustancias que iluminan, dañan o destruyen las células o tejidos diana. Preferentemente, el compuesto es no tóxico para el sujeto al que se administra o es susceptible de ser formulado en una composición no tóxica que puede administrarse al sujeto. Además, después de la exposición a la luz, el compuesto en cualquier forma fotodegradada resultante también es preferentemente no tóxico.

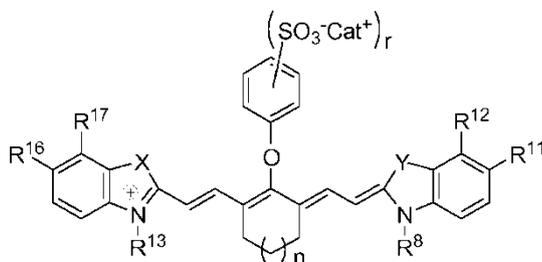
En otro aspecto, los compuestos se administran por cualquier medio conocido, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, ingestión, inyección, administración transcutánea, administración transdérmica y transiluminación. Preferentemente, los compuestos se administran a un sujeto por vía transcutánea. Por ejemplo, tal como se utiliza en la presente memoria, "transcutánea" se refiere al paso de la luz a través de tejido no roto. Cuando la capa de tejido es la piel o la dermis, el término "transcutánea" incluye "transdérmica" y se entiende que la fuente de luz es externa a la capa exterior de la piel. Sin embargo, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "transiluminación" se refiere al paso de la luz a través de una capa de tejido, tal como la capa de superficie exterior de un órgano, por ejemplo, el hígado, y, como resulta evidente, la fuente de luz es externa al órgano, pero interna o implantada en el sujeto o paciente.

En otros aspectos, el tumor, tejido u órgano diana del tratamiento se seleccionan entre el grupo que comprende tejido endotelial vascular, una pared vascular anómala de un tumor, un tumor sólido, un tumor de la cabeza, un tumor del cuello, un tumor del tubo gastrointestinal, un tumor del hígado, un tumor de la mama, un tumor de la próstata, un tumor del ovario, un tumor del útero, un tumor del testículo, un tumor del pulmón, un tumor no sólido, las células malignas de un tejido hematopoyético o un tejido linfóide, lesiones en el sistema vascular, una médula ósea enferma, tejido neuronal o tejido neuronal enfermo, y las células enfermas en las que la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria. En otra forma de realización, el tejido diana es una lesión en el sistema vascular de un tipo seleccionado entre el grupo que comprende lesiones ateroscleróticas, malformaciones arteriovenosas, aneurismas y lesiones venosas.

En otros aspectos, entre las formas de energía se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, luz (es decir, radiación), energía térmica, sónica, ultrasónica, química, lumínica, de microondas, ionizante (tal como rayos X y rayos gamma), mecánica y eléctrica. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "radiación" incluye todas las longitudes de onda y bandas de onda. Preferentemente, la longitud de onda o banda de onda de la radiación se selecciona de modo que se corresponda, o por lo menos se solape, con las longitudes de onda o bandas de onda que excitan al agente fotosensibilizante. Habitualmente, los colorantes tienen una o más bandas de onda de absorción que los excitan para producir las sustancias que iluminan, dañan o destruyen las células, tejidos, órganos

o tumores diana. Preferentemente, la longitud de onda o banda de onda de la radiación coincide con la longitud de onda o banda de onda de excitación del agente fotosensibilizante y tiene una baja absorción por parte de las células no diana y el resto del sujeto, incluidas las proteínas de la sangre.

- 5 En otros aspectos, la presente divulgación da a conocer un método para generar una imagen de un sujeto, comprendiendo dicho método: la administración de un compuesto de fórmula XXI:



- 10 al sujeto; y la generación de una imagen de dicho sujeto, en el que se ha distribuido dicho compuesto. En algunos aspectos, el compuesto se ha distribuido a un tumor, un hueso, un tejido o un órgano. El sujeto puede ser un ser humano.

15 En algunos aspectos, los compuestos colorantes se utilizan para teñir o marcar directamente una muestra, de modo que dicha muestra pueda ser identificada o cuantificada. Por ejemplo, dichos colorantes se pueden añadir como parte de un ensayo para un análisis diana biológico, tal como un elemento trazador detectable en un fluido biológico o no biológico; o para fines tales como la terapia fotodinámica de tumores, en la que una muestra teñida se irradia para destruir selectivamente las células y tejidos tumorales; o para la fotoablación de placas o células arteriales, habitualmente mediante la producción de oxígeno singlete por fotosensibilización.

20 Habitualmente, la muestra se obtiene directamente de una fuente líquida o como líquido de lavado de un material sólido (orgánico o inorgánico) o un medio de crecimiento en el que se han introducido células para su cultivo, o una solución tampón en la que se han colocado células para su evaluación. Cuando la muestra comprende células, las mismas son, opcionalmente, células individuales, incluidos microorganismos, o células múltiples asociadas con otras células en capas de dos o tres dimensiones, incluidos organismos multicelulares, embriones, tejidos, biopsias, filamentos, biopelículas y similares.

30 Una respuesta óptica detectable significa un cambio en una señal óptica, o la aparición de la misma, que es detectable mediante observación o instrumentalmente. Habitualmente, la respuesta detectable es un cambio en la fluorescencia, tal como un cambio en la intensidad, la distribución de longitudes de onda de excitación o emisión de fluorescencia, la vida útil de fluorescencia, la polarización de fluorescencia o una combinación de los mismos. El grado y/o la ubicación de la tinción, en comparación con una respuesta patrón o esperada, indica si la muestra posee una determinada característica y en qué grado la posee. Algunos colorantes de la presente invención pueden exhibir poca emisión de fluorescencia, pero siguen siendo útiles como colorantes cromóforos. Dichos cromóforos son útiles como aceptores de energía en aplicaciones de FRET, o simplemente para impartir el color deseado a una muestra o porción de una muestra.

40 Para aplicaciones biológicas, los compuestos colorantes se utilizan habitualmente en una solución acuosa, mayoritariamente acuosa o miscible en agua, preparada según métodos generalmente conocidos en la técnica. La concentración exacta de compuesto colorante depende de las condiciones experimentales y los resultados deseados, pero son posibles intervalos comprendidos entre 0,00001 mM y 0,1 mM, tal como entre aproximadamente 0,001 mM y aproximadamente 0,01 mM. La concentración óptima se determina mediante la variación sistemática hasta obtener resultados satisfactorios con una fluorescencia mínima de fondo.

45 De la forma más ventajosa, los compuestos colorantes se utilizan para teñir muestras con componentes biológicos. La muestra puede comprender mezclas heterogéneas de componentes (por ejemplo, incluyendo células intactas, células fijadas, extractos celulares, bacterias, virus, orgánulos y mezclas de los mismos), o un solo componente o grupo homogéneo de componentes (por ejemplo, aminoácidos naturales o sintéticos, ácidos nucleicos o polímeros de hidratos de carbono, o lípidos complejos de membrana). En general, estos colorantes son no tóxicos para las células vivas y otros componentes biológicos, dentro de las concentraciones de uso.

55 El compuesto colorante se combina con la muestra de cualquier manera que facilite el contacto entre el compuesto colorante y los componentes de la muestra de interés. En general, simplemente se añade a la muestra el compuesto colorante o una solución que lo contiene. Algunos colorantes, en particular aquellos que están sustituidos con uno o más restos de ácido sulfónico, tienden a no traspasar las membranas de las células biológicas y habitualmente, una vez dentro de células viables, se mantienen bien retenidos. Los tratamientos que permeabilizan la membrana plasmática, tales como electroporación, tratamientos de choque o concentración alta de ATP extracelular, se pueden

utilizar para introducir compuestos colorantes seleccionados en las células. Alternativamente, los compuestos colorantes seleccionados se pueden insertar físicamente en las células, por ejemplo mediante microinyección a presión, carga por raspado, métodos de registro zonal o fagocitosis.

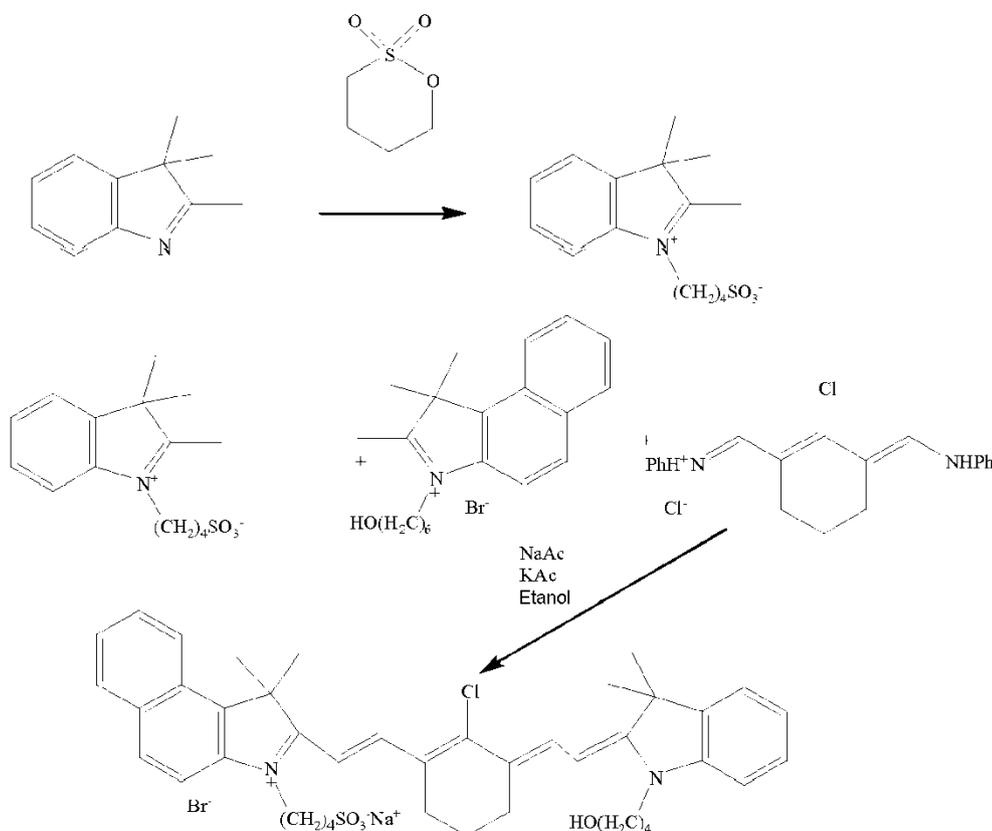
- 5 En cualquier momento posterior o simultáneo a la tinción, la muestra se ilumina con una longitud de onda de luz seleccionada para dar una respuesta óptica detectable, y se observa con un medio para detectar la respuesta óptica. Entre el equipo útil para la iluminación de los compuestos colorantes se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, lámparas ultravioleta manuales, lámparas de arco de mercurio, lámparas de xenón, láseres y diodos láser.
- 10 Opcionalmente, estas fuentes de iluminación están integradas en escáneres láser, lectores de microplacas de fluorescencia, fluorómetros estándar o minifluorómetros, o detectores cromatográficos. Las formas de realización preferidas de la presente invención son colorantes excitables exacta o aproximadamente a las longitudes de onda 633-636 nm, 647 nm, 660 nm, 680 nm y mayores de 700 nm, tal como 780 nm, 810 nm y 850 nm, ya que estas regiones coinciden estrechamente con la salida de fuentes de excitación relativamente económicas.
- 15 Opcionalmente, la respuesta óptica se detecta mediante inspección visual o utilizando cualquiera de los siguientes dispositivos: cámaras CCD, cámaras de vídeo, película fotográfica, dispositivos de escaneo por láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, microscopios de epifluorescencia, microscopios de barrido, citómetros de flujo, lectores de microplacas de fluorescencia o mediante elementos de amplificación de la señal, tales como tubos fotomultiplicadores. Cuando la muestra se examina con un citómetro de flujo, el examen de la misma incluye, opcionalmente, la clasificación de porciones de la muestra en función de su respuesta de fluorescencia.
- 20

Ejemplos

- 25 La siguiente sección muestra una de las síntesis preferidas para la preparación de diversos compuestos obtenidos de acuerdo con la presente divulgación, así como los datos experimentales para determinados compuestos. Esta sección también proporciona ejemplos para el uso de los compuestos. Los ejemplos pretenden ser ilustrativos, no limitativos.

Ejemplo de referencia 1: Síntesis de un colorante cianina intermedio

30



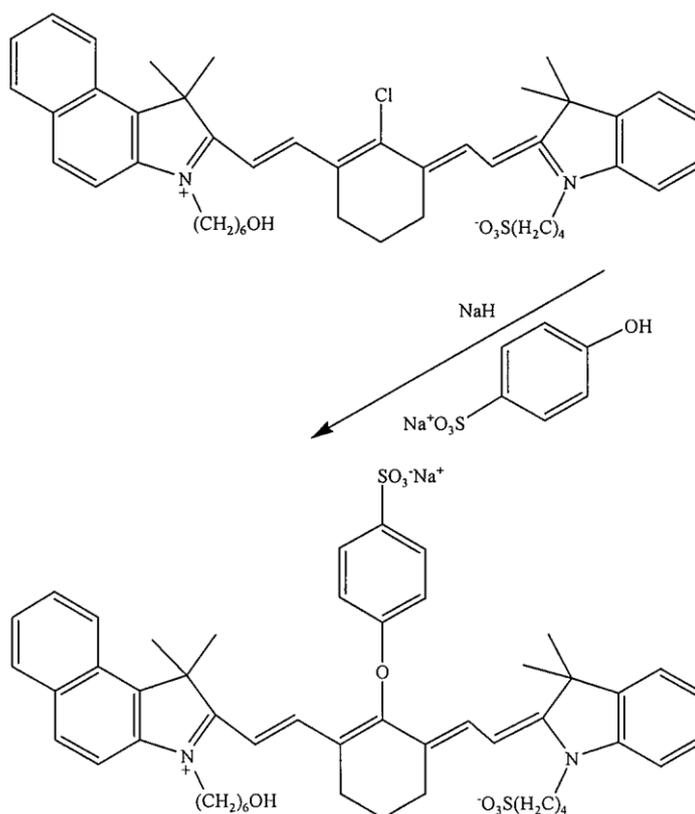
- 35 **Etapa A:** síntesis de sal cuaternaria de indolsulfonato: Se calentó una mezcla de 160 g (1.000 mmol) de 1,1,2-trimetil-1H-indol (ALDRICH) y 340,4 g (256 ml; 2.500 mmol; ALDRICH) de butanosulfona a 125°C en un matraz de fondo redondo de 1 l con 400 ml de diclorobenceno en atmósfera de nitrógeno. Tras 16 horas, la reacción se detuvo y se enfrió a temperatura ambiente. El sólido que cristalizó en la mezcla de reacción se filtró y se lavó con éter (150 ml). El sólido obtenido se disolvió en un volumen mínimo de metanol (300 ml) y se precipitó mediante la adición de

acetona (1.600 ml). El sólido se filtró y se lavó con acetona (150 ml x 2). Se secó al vacío y se obtuvieron 261,3 g (88,5%) de la sal cuaternaria. Era lo suficientemente pura para su utilización en la siguiente etapa.

5 **Etapa B:** síntesis de sal cuaternaria de bencindol alcohol: La sal cuaternaria se preparó de acuerdo con el procedimiento de la patente US nº 6.027.709. En este caso, se utilizaron 92,0 g de 1,1,2-trimetil-1H-bencindol (ACROS) y se obtuvieron 113,0 g (60% de rendimiento) de sal cuaternaria de bencindol alcohol pura.

10 **Etapa C:** síntesis del colorante cloro: Una mezcla que contenía sal cuaternaria de bencindol alcohol (39 g; 100 mmol), sal cuaternaria de indolsulfonato (20,5 g; 100 mmol), en etanol (400 ml) se agitó en atmósfera de nitrógeno durante 10 a 15 min para obtener la solución uniforme. A esta solución se le añadió base de Schiff (35,9 g; 100 mmol; ALDRICH), seguido de la adición de 100 ml de etanol. La solución de color rojo oscuro se calentó a 60°C. A esta temperatura, se añadió acetato de sodio (21,32 g; 130 mmol), seguido de 12,80 g de acetato de potasio (130 mmol). La temperatura se elevó para obtener un reflujo vigoroso (110°C a 115°C) y se mantuvo a este reflujo durante 35 a 40 min. La reacción se detuvo y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre un baño de hielo (1 l) cuando se formó un producto oleoso que se depositó en el fondo. El agua se decantó y el procedimiento se repitió hasta que los lavados con agua eran transparentes. El producto oleoso se trituro con éter (150 ml x 3) y a continuación con acetato de etilo (150 ml x 3). El producto parcialmente solidificado se disolvió en metanol (350 ml) y a continuación el metanol se eliminó por evaporación en un rotavapor. El colorante sólido se secó al vacío. Se purificó adicionalmente por cromatografía en columna (gel de sílice 60, 35-75 mm; gradiente de disolvente: 10% de metanol en acetonitrilo a 30% de metanol en acetonitrilo), obteniéndose un colorante cloro puro (29,0 g; rendimiento del 40%).

Ejemplo de referencia 2: Síntesis de un colorante cianina

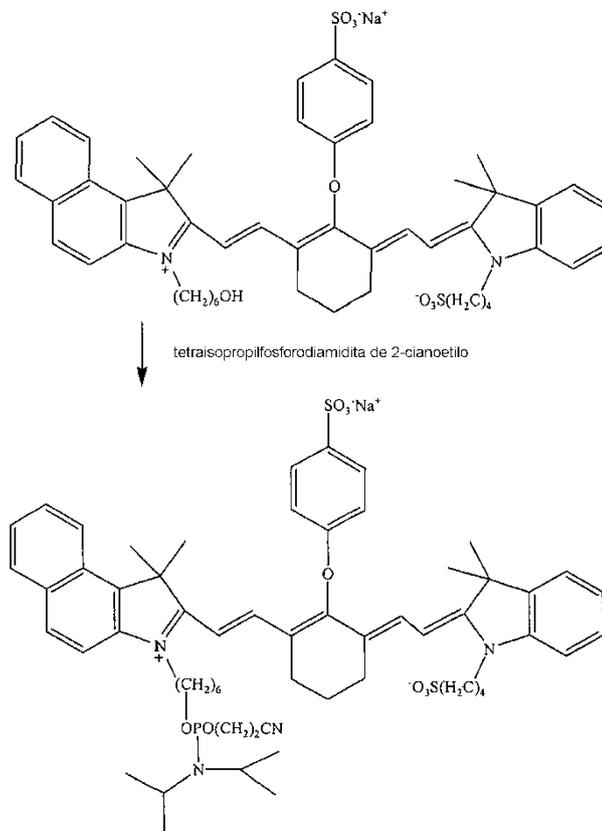


25 **Síntesis de colorante sulfo-fenoxi:** En 40 ml de DMF seco se disolvieron 2,95 g (12,70 mmol) de ácido 4-hidroxibencenosulfónico. Tras añadir 1,08 g (60%; 26,8 mmol) de hidruro de sodio, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min en atmósfera de nitrógeno. El colorante cloro del ejemplo 1 (7,41 g; 10 mmol), disuelto en 25 ml de DMF seco, se añadió a la mezcla de reacción y se agitó adicionalmente durante 45 a 50 min. Un máximo de absorción de 788 nm al final de este período indicó un desplazamiento hipocrómico de 13 nm (colorante cloro, absorción a 801 nm), y por consiguiente la formación del colorante sulfo-fenoxi. Se añadió hielo seco a la mezcla de reacción y el DMF se eliminó al vacío. El colorante en bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60; gradiente de disolvente: 10% de metanol en acetonitrilo a 30% de metanol en acetonitrilo), obteniéndose 4 g del colorante puro (rendimiento del 45%).

30

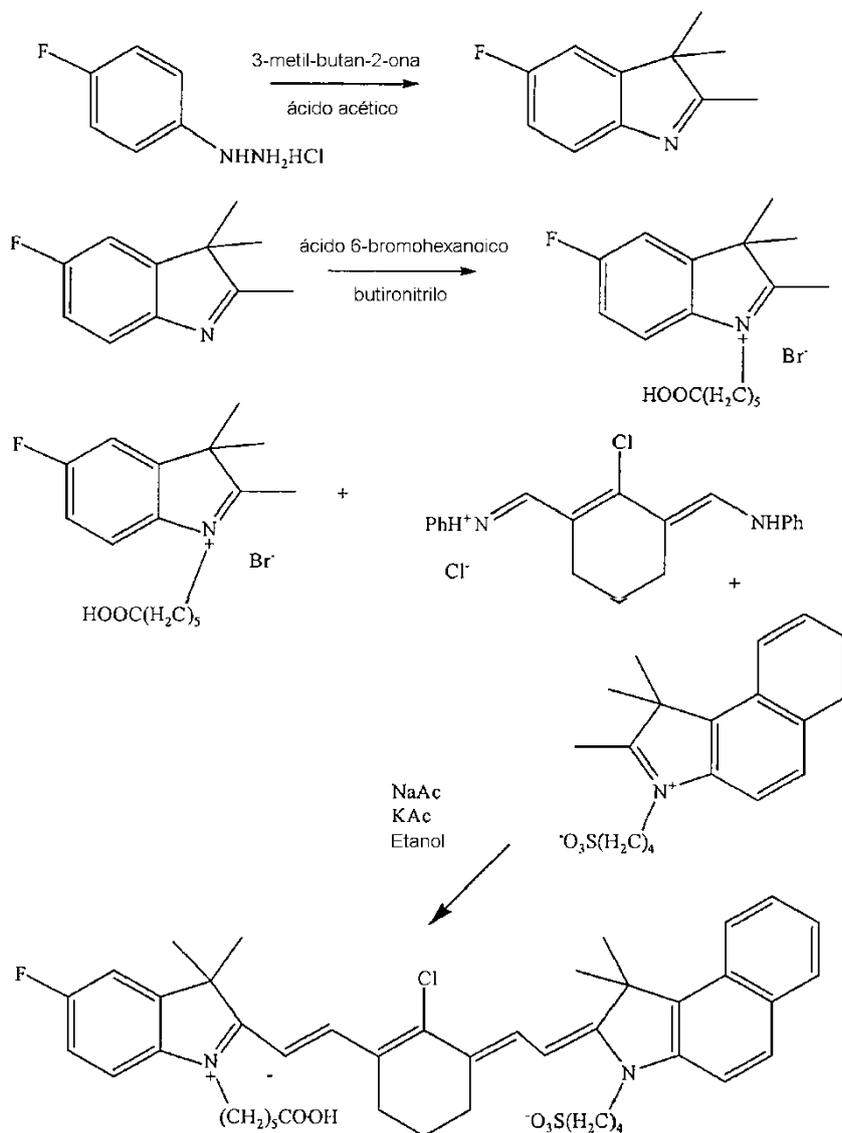
35

Ejemplo de referencia 3: Síntesis de un colorante cianina sulfo-fenoxi fosforamidita



- 5 Síntesis de un colorante sulfo-fenoxi: En 20 ml de cloruro de metileno seco se disolvieron 1,4 g (1,59 mmol) del colorante sulfo-fenoxi anterior y la solución se enfrió en un baño de hielo-acetona con agitación en atmósfera de nitrógeno. Tras añadir 0,6 g (1,01 ml; 3,18 mmol) de tetraisopropilfosforodiamidita de 2-cianoetilo y 0,045 g (1,3 ml; 0,64 mmol) de solución de 1-H-tetrazol (0,5 M) a 0°C, la solución se agitó a temperatura ambiente de 2 a 2,5 horas.
- 10 Se añadió a la mezcla de reacción cloruro de metileno que contenía el 1% de trietilamina y a continuación la mezcla de reacción se sometió a lavados con bicarbonato sódico al 5% (50 ml x 2) y agua (50 ml x 2). Tras el secado sobre sulfato de sodio anhidro, la solución se filtró y el filtrado se concentró a 5 ml. La solución concentrada se añadió a 0°C a hexano (50 ml) con agitación y en atmósfera de nitrógeno. El residuo viscoso obtenido tras la decantación del hexano se trituró con éter (50 ml), obteniéndose un polvo sólido. Se secó al vacío, obteniéndose un polvo verde de sulfo-fenoxi fosforamidita (1,0 g; rendimiento del 58%).
- 15

Ejemplo de referencia 4: Síntesis de un colorante cianina intermedio



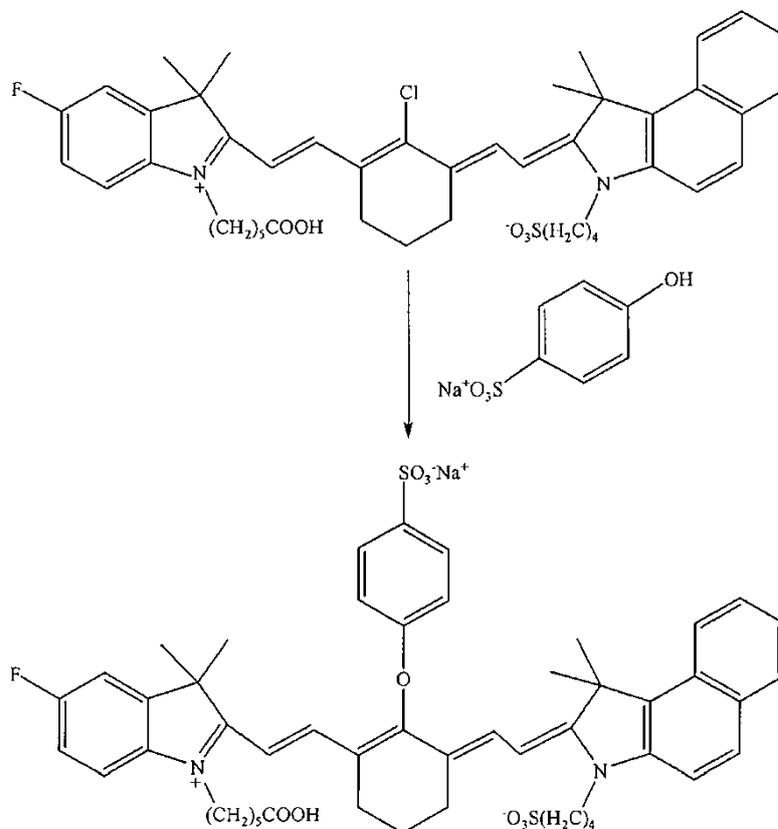
5 **Etapa A:** síntesis de 5-fluoro-indol: Una mezcla que contenía clorhidrato de 4-fluorofenilhidrazina (5,0 g; 30,75 mmol; ALDRICH), 3-metil-2-butanona (3,7 g; 43 mmol; ALDRICH) y ácido acético (30 ml) se agitó durante 30 min en atmósfera de nitrógeno, obteniéndose una solución transparente. A continuación, la mezcla se sometió a reflujo a 130°C. La aparición de un máximo de absorción de UV-Vis a 255 nm y la desaparición del pico a 282 nm confirmó la formación del indol. Al cabo de 40 minutos, la reacción se detuvo y la mezcla se vertió en hielo picado (100 g). El residuo se extrajo en acetato de etilo (100 ml x 2), se lavó con agua (100 ml x 2) y la capa de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Tras la filtración, se eliminó el acetato de etilo y el residuo se secó, obteniéndose 4,15 g del indol (rendimiento del 76%).

15 **Etapa B:** síntesis de sal de carboxilato de 5-fluoroindol: Una mezcla que contenía 5-fluoroindol (3,0 g; 16,9 mmol), ácido 6-bromohexanoico (5,38 g; 27,6 mmol; ALDRICH) en 90 ml de butironitrilo se llevó a reflujo en atmósfera de nitrógeno a 140-145°C. La cuaternización se completó al cabo de entre 35 y 40 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trituroó con éter, y finalmente se secó al vacío, obteniéndose el sólido (6,0 g; rendimiento del 95%).

20 **Etapa C:** síntesis de sal cuaternaria de bencindolsulfonato: Esta sal se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para la síntesis de sal cuaternaria de indolsulfonato, tal como se ha descrito en la etapa A del ejemplo 1.

25 **Etapa D:** síntesis de colorante cloro: El producto de la etapa C se convirtió en un colorante cloro mediante el procedimiento descrito en la etapa C del ejemplo 1. En este caso, se utilizaron 0,4 g (1 mmol) de sal de carboxilato de 5-fluoroindol y 0,35 g (1 mmol) de sulfonato de bencindol para obtener 0,27 g (rendimiento del 35%) del colorante cloro.

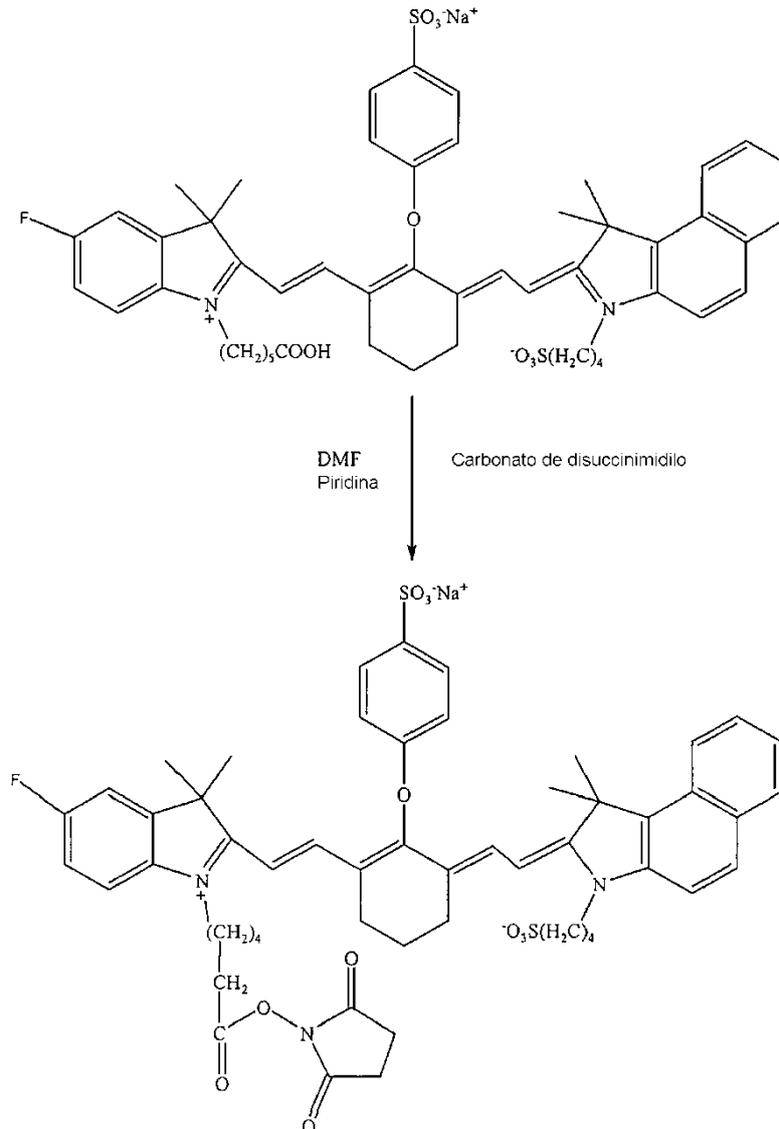
Ejemplo de referencia 5: Síntesis de un colorante cianina



5

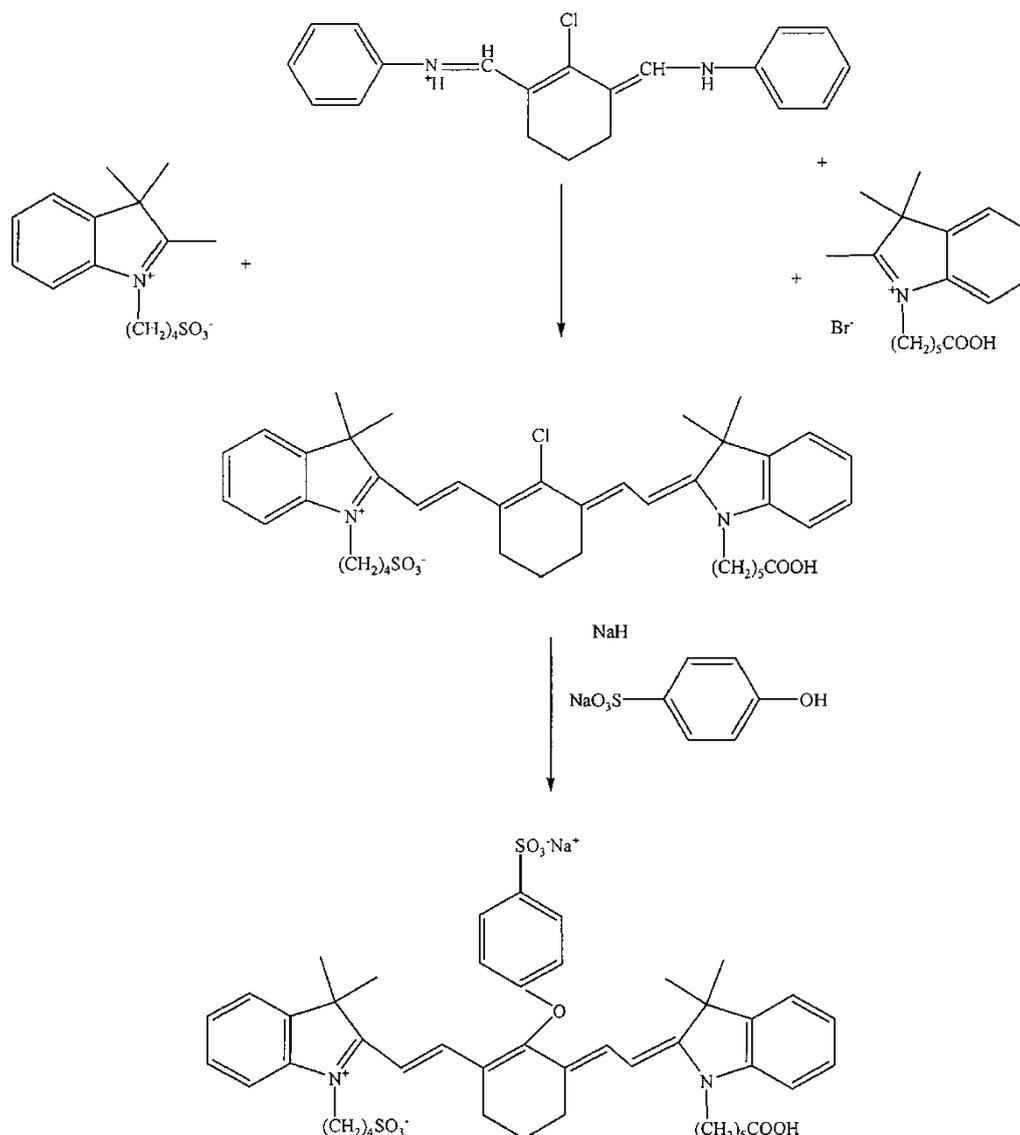
Síntesis de un colorante sulfo-fenoxi asimétrico: El colorante cloro del ejemplo 4 se convirtió en un colorante sulfo-fenoxi mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Utilizando 0,7 g (0,91 mmol) del colorante cloro, se obtuvieron 0,4 g (rendimiento del 48%) del colorante sulfo-fenoxi puro.

Ejemplo de referencia 6: Síntesis de un colorante cianina de éster de NHS



- 5 Síntesis de colorante de éster de NHS: Se disolvió colorante de carboxialquilo (0,27 g; 0,3 mmol) que contenía 5-fluoroindol y un grupo sulfo-fenoxi central en una mezcla de DMF seco (3,0 ml) y piridina seca (0,3 ml). Se añadió carbonato de disuccinimidilo (DSC, ALDRICH, 0,115 g; 0,44 mmol) y la mezcla se agitó a 60°C durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno. Después de diluir la mezcla con éter (15 ml) y decantar el sobrenadante, el producto se volvió a disolver en DMF seco (2 ml). Se añadió éter (15 ml) gota a gota con agitación para obtener el precipitado sólido. Se filtró y se secó al vacío, obteniéndose 0,25 g del colorante reactivo (rendimiento del 84%). La formación
- 10 del éster activo se confirmó por HPLC.

Ejemplo de referencia 7: Síntesis de un colorante cianina



5 **Etapa A:** síntesis de sal cuaternaria de 1-(4-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetilindolinina: Se calentaron una mezcla de 1,2,3-trimetilindolenina (15,9 g, 100 mmol) y 1,4-butanosulfona (27,2 g, 200 mmol) a 140°C en 250 ml de 1,2-diclorobenceno durante 16 horas. El residuo gomoso resultante se separó por decantación del disolvente, se disolvió en una cantidad mínima de metanol y se precipitó con acetona. El precipitado de color rosa se filtró y se secó al vacío. Rendimiento: 85%

10 **Etapa B:** síntesis de sal cuaternaria de 1-(6-carboxipentil)-2,3,3-trimetilindolenina: Una mezcla de 1,2,3-trimetilindolenina (8 g, 50 mmol) y ácido 6-bromohexanoico (19 g, 100 mmol) se calentó a reflujo en 250 ml de butironitrilo durante 36 horas. El residuo gomoso resultante, obtenido tras la eliminación del disolvente mediante rotavapor, se disolvió en una cantidad mínima de cloroformo y se precipitó con éter. El precipitado se trituró con éter para obtener un polvo seco de grano suelto. Rendimiento: 70%

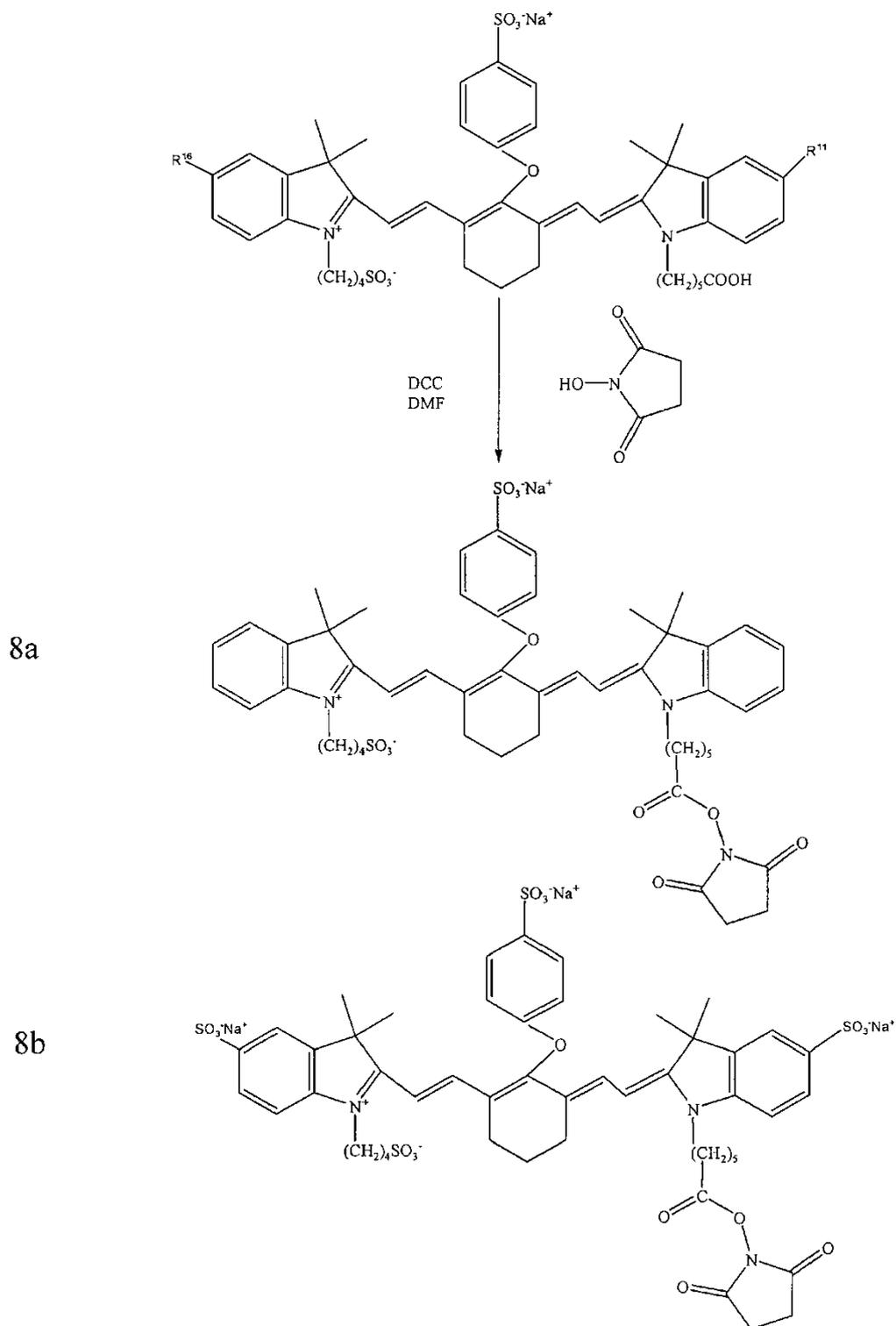
15 **Etapa C:** síntesis de colorante cloro: Una mezcla de 5 mmol de cada una de las sales cuaternarias de la etapa A y la etapa B, junto con monohidrócloruro de N-[(3-anilinoetil)-2-cloro-1-ciclohexen-1-il]metilén]anilina (1,30 g, 5 mmol) y acetato de sodio (1,1 g, 13 mmol) se sometió a reflujo en 30 ml de etanol seco durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió para eliminar el etanol por rotavapor. El residuo se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice de fase inversa C18 (metanol-agua, 3:2), obteniéndose un 30% del colorante cloro deseado.

20 **Etapa D:** síntesis de colorante sulfo-fenoxi: Se preparó una solución de sal disódica del ácido 4-hidroxibenzenosulfónico del siguiente modo: A una suspensión del 60% de hidruro de sodio (120 mg, 3 mmol de NaH al 100%) en 10 ml de DMF seco, enfríada a 0°C en atmósfera de nitrógeno, se añadió una solución en DMF (10 ml) de ácido 4-hidroxi-benzenosulfónico dihidrato (2 mmol, ALDRICH). Después de 10 minutos, los contenidos de

5 reacción se calentaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, los contenidos se transfirieron a un matraz que contenía 1 mmol del colorante cloro en 30 ml de DMF con agitación vigorosa a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante el espectro de absorción UV-Vis, que mostró un desplazamiento hipsocrómico de 782 nm a 769 nm. Después de 30 minutos, la reacción se inactivó con hielo seco. El DMF se evaporó en un rotavapor. La precipitación con éter proporcionó el producto en bruto en forma de polvo seco, que se purificó adicionalmente en columna de gel de sílice de fase inversa C18 utilizando metanol acuoso al 40%. Rendimiento: 75%. El producto puro se caracterizó por RMN de protones.

10 Etapa E: Síntesis del éster de NHS del colorante sulfo-fenoxi: Se disolvieron 2,6 mg del colorante sulfo-fenoxi (0,0031 mmol) en 250 µl de DMF seco en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, al que se añadieron 4,5 mg de N-hidroxisuccinimida (0,039 mmol, ALDRICH) y 10 mg de DCC (0,05 mmol, ALDRICH). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y el progreso de la reacción se controló por HPLC. Los reactivos en exceso se eliminaron por precipitación con éter y el colorante-NHSE en bruto se recogió por centrifugación del precipitado y se purificó adicionalmente en columna de cromatografía HPLC de fase inversa RPC18 preparativa (INERTSIL, ODS
15 3,5 µm, 250 x 4,6 mm). Se eluyó con un gradiente de disolvente de tampón AB 90-10% a amortiguador 100% B (A = 4% de acetonitrilo en TEEAc 0,1 M y B = 80% de acetonitrilo en TEEAc 0,1 M). Las fracciones se agruparon y el disolvente se eliminó en evaporador Speed Vac, obteniéndose 2 mg de éster puro. La presencia del éster de NHS se confirmó por HPLC.

EJEMPLO 8: Síntesis de un colorante cianina de éster de NHS



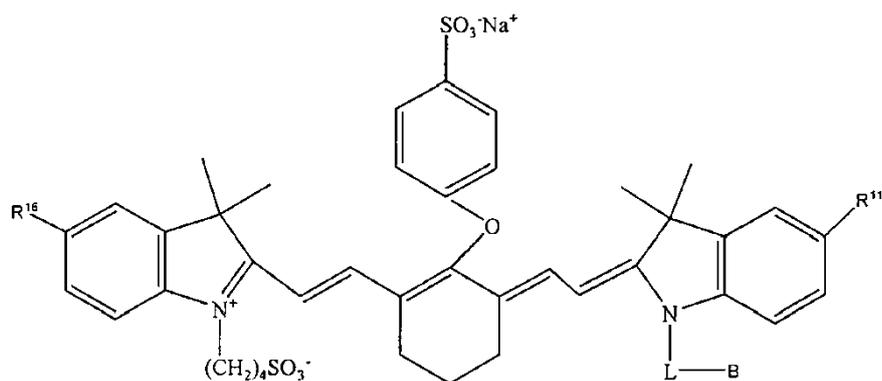
- 5 Síntesis de colorante de éster de NHS 8a-8i: El colorante de carboxialquilo del ejemplo 7 (2,6 mg; 0,0031 mmol) se disolvió en DMF seco (250 μ l). A esta solución se añadió N-hidroxisuccinimida (ALDRICH; 4,5 mg; 0,039 mmol) y diciclohexilcarbodiimida (DCC; ALDRICH; 10 mg; 0,05 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se controló por HPLC y el éster de NHS se purificó pasándolo a través de la columna de fase inversa (INERTSIL, ODS 3,5 μ m, 250 x 4,6 mm) y eluyendo con un gradiente de disolvente desde 10% b (a = 4% de acetonitrilo en acetato de trietilamonio 0,1 M; b = 80% de acetonitrilo en acetato de trietilamonio 0,1 M) hasta 100% a. El disolvente se eliminó al vacío, obteniéndose 2 mg del éster de NHS puro. La presencia del grupo éster de NHS reactivo en el colorante 8a se confirmó por HPLC. Los colorantes 8b-8i (a continuación) se pueden sintetizar por
- 10

procedimientos análogos.

Colorante	R ¹¹	R ¹⁶
8a*	H	H
8b*	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻
8c	F	F
8d	H	SO ₃ ⁻
8e	SO ₃ ⁻	H
8f	H	F
8g	F	H
8h	SO ₃ ⁻	F
8i	F	SO ₃ ⁻

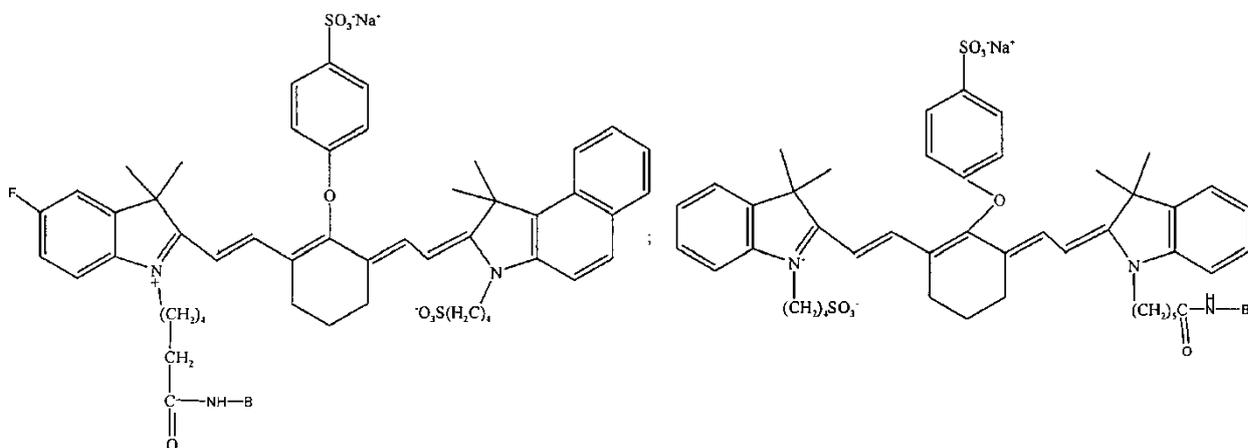
* ejemplo de referencia

- 5 Síntesis de diferentes conectores: El procedimiento mostrado anteriormente se puede llevar a cabo con una amplia variedad de conectores (L) para la fijación del colorante a la biomolécula. Por ejemplo, entre los conectores adecuados se incluyen un enlace directo o un enlace covalente, en el que el enlace covalente es lineal o ramificado, cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, que tiene de 1 a 60 átomos seleccionados entre el grupo que comprende C, N, P, O y S, en el que L puede tener átomos de hidrógeno adicionales para cubrir valencias, en el que el enlace contiene cualquier combinación de enlaces éter, tioéter, amina, éster, carbamato, urea, tiourea, oxi o amida; o enlaces carbono-carbono simples, dobles, triples o aromáticos; o enlaces fósforo-oxígeno, fósforo-azufre, nitrógeno-nitrógeno, nitrógeno-oxígeno o nitrógeno-platino; o enlaces aromáticos o heteroaromáticos.
- 10

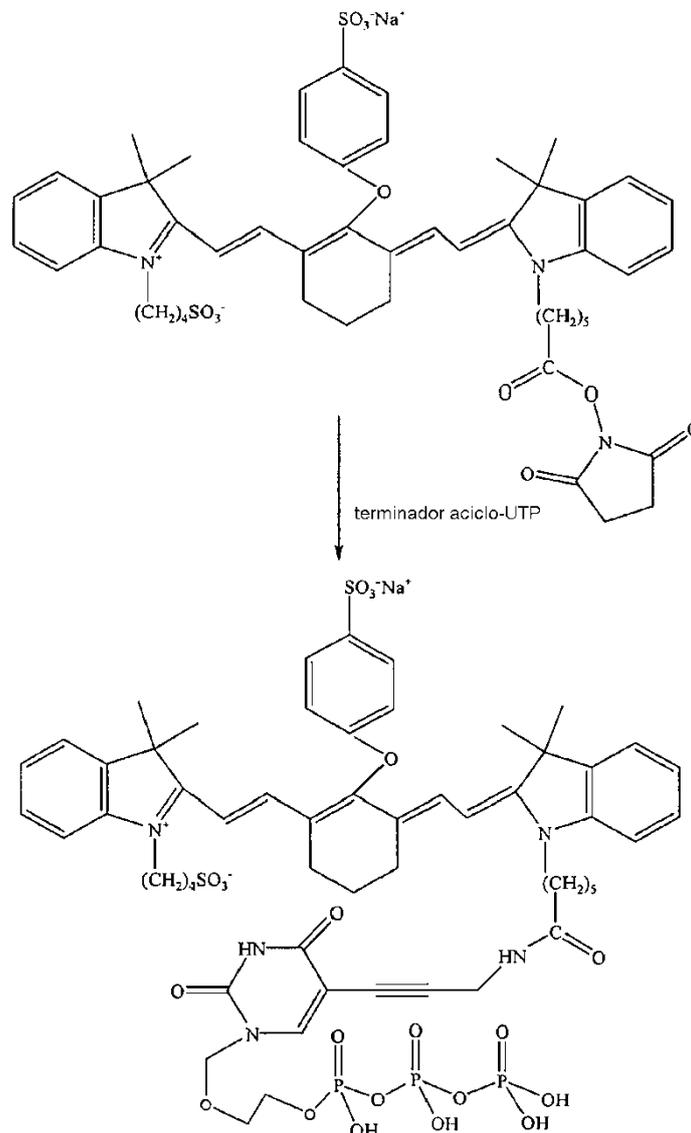


- 15 Por ejemplo, haciendo referencia a la tabla 1, la columna A es una lista de las funcionalidades reactivas, que pueden encontrarse en el colorante o en la biomolécula. La columna B es una lista de los grupos complementarios, ya sea en la biomolécula o en el colorante (preferentemente, una funcionalidad carboxilo, hidroxilo, tiol o amino), que, junto con las funcionalidades reactivas, forman el enlace resultante de la columna C. El grupo enlazante comprende el enlace resultante y, opcionalmente, los átomos adicionales, tal como se ha descrito anteriormente.
- 20

En algunos aspectos, el conjugado colorante-biomolécula de los ejemplos 4 y 7 puede tener las siguientes estructuras:



25

EJEMPLO 9: Síntesis de un aciclo-UTP marcado con colorante

- 5 El colorante del ejemplo 8 se conjugó con éxito a terminadores aciclo-ATP, GTP, CTP y UTP. Estos terminadores no marcados se obtuvieron a través de NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS, INC., Boston, Massachusetts. Los terminadores marcados con colorante se purificaron hasta una pureza > 95% por HPLC. Sus concentraciones se determinaron mediante espectros de absorción de UV-visible obtenidos en tampón de fosfato acuoso. Los análogos marcados se utilizaron en secuenciación de ADN y se obtuvo una escalera de secuencia de alta calidad con los análogos con el colorante incorporado. El aciclo-UTP marcado con colorante se ha ilustrado anteriormente.

Ejemplo de referencia 10: marcado de ADN

- 15 La fosoramidita del colorante sulfo-fenoxi del ejemplo 2 se utilizó para marcar moléculas de ADN preparadas en una máquina de síntesis de ADN. El colorante se unió al extremo 5' del oligonucleótido protegido, unido a soporte, mediante la química de desprotección de fosoramidita. En síntesis a escala de 200 nmol, los rendimientos crudos típicos de oligonucleótidos marcados con colorante fenoxi están comprendidos entre 65 y 95 nmol. Los oligonucleótidos marcados con colorante sulfo-fenoxi se obtuvieron a razón de entre 100 nmol y 125 nmol.

20 Ejemplo de referencia 11: Estabilidad de colorante sulfo-fenoxi en NH_4OH y ditioneitol (DTT)

- 25 El colorante sulfo-fenoxi del ejemplo 2 y el correspondiente colorante fenoxi (200 nmol de cada) de la misma estructura, excepto con un H en lugar del sulfonato en el colorante fenoxi, se trataron con 400 μl de hidróxido de amonio concentrado y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió otro lote de 400 μl de hidróxido de amonio concentrado y se agitó durante 5 horas adicionales. Estas son las condiciones que se utilizan en la desprotección de los cebadores marcados con colorante. La reacción se controló por TLC en intervalos de 15

minutos. En el caso del colorante fenoxi, la formación de la impureza de color azul se observó al cabo de 15 minutos. La intensidad de esta impureza aumentó con el tiempo. Al cabo de 1,5 horas, casi la mitad del colorante se descompuso para dar un colorante azul. La mancha azul se aisló y se obtuvieron los espectros de absorción y emisión. La impureza de color azul dio lugar a un máximo de absorción a 655 nm y de emisión a 747 nm. En condiciones idénticas, el colorante sulfo-fenoxi no formó ninguna mancha de color azul que pudiera identificarse por TLC o absorción. Esto muestra claramente que la presencia del grupo sulfonato en el fenoxi mejora la resistencia del colorante a la degradación por amoníaco.

Para estudiar la resistencia al ataque por DTT, cada uno de estos dos colorantes (200 nmol de cada) se trató con 400 µl de DTT en acetonitrilo y se agitó a temperatura ambiente. Tras agitar durante la noche (16 horas), la TLC indicó la formación de nuevas manchas para el colorante sin el sulfonato en el grupo fenoxi. Estos productos de degradación se aislaron y se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis. Las tres manchas presentaron un máximo de absorción a 786 nm, 738 nm y 392 nm, respectivamente. La absorción a 738 nm indica la formación de un nuevo colorante degradado debida a la descomposición del colorante fenoxi, que absorbe a 787 nm. La mancha reconocible de impureza no apareció hasta pasadas de 7 a 8 horas. En condiciones idénticas durante la noche, el colorante sulfo-fenoxi del ejemplo 2 no dio lugar a ninguna mancha que absorbiera a 738 nm. Claramente, la presencia del grupo sulfonato en el anillo fenoxi mejora la resistencia del colorante al ataque por DTT.

Los dos colorantes (“fenoxi” y “sulfo-fenoxi”) tienen propiedades ópticas similares, tales como el máximo de absorción y el coeficiente de extinción. Estos datos muestran la estabilidad inesperadamente mejorada que se obtiene mediante la sustitución de un hidrógeno del anillo fenoxi con un grupo sulfonato. Puesto que los problemas de estabilidad son comunes a los colorantes cianina de esta familia química, también se obtiene una mejora similar para los otros colorantes.

El colorante 8a se utilizó para marcar la estreptavidina. Se sacó del frigorífico una cantidad de estreptavidina y se sometió a análisis por UV-Vis para determinar la cantidad. A esta estreptavidina se le añadieron 2,5 equivalentes de colorante 8a. Se dejó progresar la reacción de marcado (a pH 7,4) durante 2 horas a 4°C y a continuación la mezcla de reacción se transfirió a un casete de diálisis MWCO 10K. La diálisis se llevó a cabo durante aproximadamente 64 horas, con un total de 3 cambios de tampón de 1 litro de 1X PBS cada uno. El análisis por UV-Vis de la estreptavidina tras la diálisis puso de manifiesto que la estreptavidina estaba marcada con el colorante 8a.

Ejemplo 12

A. Caracterización del conjugado EGF-colorante 8b (ensayos in vitro)

Se marcó EGF comercialmente disponible en los grupos amino libres utilizando un derivado de éster de NHS del colorante 8b del ejemplo 8, de modo similar al marcado de la estreptavidina con el colorante 8b descrito anteriormente. El conjugado de colorante se purificó por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Se evaluaron la especificidad y la actividad del EGF-colorante 8b con cultivos confluentes de células PC3M-LN4 y 22Rv1 utilizando un ensayo en microplaca in vitro (In-cell Western; Chen, H. y otros 2005. Anal. Biochem. 338:136-142) escaneado en Aeries™. (LI-COR® Biosciences, Lincoln, Nebraska). La actividad biológica del conjugado se verificó por su capacidad para estimular la actividad de la cinasa del receptor de EGF. La figura 1 muestra el resultado de las provocaciones de especificidad realizadas in vitro. En el gráfico A, se representa la unión de la sonda EGF-colorante 8b a las células PC3M-LN4 y 22Rv1. El gráfico B ilustra la baja afinidad del colorante 8b no conjugado y corresponde al nivel basal observado en el gráfico A. En los gráficos C y D, la unión del colorante 8b marcado se bloqueó eficazmente mediante el pretratamiento de las células con EGF (C) o C225 (D) sin marcar a 1,25 µg/ml o 9,4 µg/ml, respectivamente.

B. Formación de imágenes de animales in vivo

Se implantaron células PC3M-LN4 o 22Rv1 (10^6) por vía subcutánea en la región costal de ratones SCID (4 animales por tipo de célula). El crecimiento de los tumores se controló durante 6 semanas por palpación, medición del calibre y formación de imágenes ópticas. Para la formación de imágenes, se inyectó una sonda EGF-colorante 8b esterilizada por filtración (1-2 nmol por animal) a través de la vena caudal en ratones anestesiados con isoflurano. A continuación se recogieron imágenes en los puntos temporales indicados. Se llevó a cabo una formación de imágenes por fluorescencia en el IR cercano de animales vivos con un prototipo de generador de imágenes LI-COR Biosciences para animales pequeños. El instrumento LI-COR® es una caja hermética a la luz equipado con una cámara CCD refrigerada, iluminación de áreas a través de diodos láser y filtros de luz sintonizados para el colorante 8b. Se obtuvieron imágenes y se analizaron con el software Wasabi de Hamamatsu Photonics (Hamamatsu, Japón).

C. Análisis de imágenes

Las imágenes analizadas en una serie se normalizaron a la misma LUT (“look-up table” cuadro de búsqueda) con un valor mínimo y máximo común para su presentación visual. Las regiones de interés (ROI) de igual área se utilizaron para las regiones tumoral y de fondo. Las ROI se cuantificaron mediante los valores de píxeles totales y píxeles medios. La desviación estándar de la media de los fondos se calculó utilizando de 3 a 5 ROI. Este cálculo

proporciona el número de desviaciones estándar sobre el fondo que representaría un tumor sospechoso.

$$\text{SNR} = \frac{(\text{Tumor de intensidad media}) - (\text{Media de intensidad de fondo})}{\text{Desviación estándar de la media de fondos}}$$

5 D. Cinética de la eliminación de la sonda

En primer lugar, se evaluó la eliminación de la sonda en un animal sin presencia de tumor. La figura 2 ilustra la eliminación del EGF-colorante 8b a lo largo de 24 horas. Se analizaron dos ROI. La ROI grande cubría todo el interior del organismo, mientras que la ROI pequeña se centraba únicamente en la región abdominal.

10 Los resultados mostraron la señal de pico del EGF-colorante 8b a las 3,75 horas de la inyección, independientemente del tamaño de la ROI. La acumulación en la vejiga se observaba claramente al cabo de 1 hora y el 95% de la intensidad de señal total había disminuido al cabo de 24 horas. A continuación, se evaluó la eliminación de la sonda en un animal con tumor utilizando la SNR como una medida. Se tomaron una serie de imágenes para determinar el tiempo óptimo de formación de imágenes posterior a la inyección a fin de llevar a cabo un estudio longitudinal. Tras la inyección a través de la vena caudal, se obtuvieron imágenes del ratón a las 0,3, 24, 48, 72 y 96 horas, observándose la mayor SNR en el día 4 (figura 3).

20 E. Detección precoz de tumores

La formación de imágenes se inició dos semanas después de implantar células tumorales en los ratones SCID. El límite de detección se determinó mediante la evaluación de una imagen que contenía dos manchas pequeñas (< 0,5 mm) en el área de interés. Se determinó que las SNR eran de 3,20 y 2,43 para las dos manchas pequeñas en la semana 2. Al cabo de una semana, se repitieron la inyección y la formación de imágenes. La imagen de la semana 3 puso de manifiesto que la primera mancha es mayor y se confirmó que era una señal de tumor mediante palpación, mientras que la segunda mancha ya no era visible y se determinó que era un artefacto.

25 F. Análisis de la sección tisular

30 Se llevó a cabo una provocación competitiva durante la semana 5 con un animal que recibió uno de los siguientes tratamientos: 1) EGF-colorante 8b (2 nmol); 2) sólo colorante 8b (3 nmol); 3) 2 mg/ml de C225 (un anticuerpo monoclonal para el receptor de EGF (Erbix, ImClone) más EGF-colorante 8b (2 nmol) 24 horas después de la inyección de C225, y 4) 0,9% de inyección simulada de solución salina. Tras la formación final de imágenes (día 4 después de la inyección), los animales se sacrificaron. Los tumores se pesaron, se midieron y se prepararon secciones congeladas de los mismos (0,8 mm de espesor) para analizarlas en el sistema de imágenes por infrarrojos Odyssey® (LI-COR). Las comparaciones de las secciones tisulares entre EGF-colorante 8b y C225 + EGF-colorante 8b mostraron una disminución del 54% de la señal cuando se administró C225 24 horas antes del EGF-colorante 8b. Cuando únicamente se administró colorante 8b, se mantuvo cierta cantidad de señal en el tumor, tal como se observa también in vitro.

40

Tratamiento	ID	Int 700	Int 800	Área (mm ²)	Int 800/área (mm ²)	Media
A) Solución salina al 0,9%	C2P0	4,5	0,89	65,32	0,01	0,01
		3,5	0,34	65,33	0,01	
B) colorante 8b	C2P2	1,45	18,7	30,06	0,62	0,56
		1,24	13,18	26,22	0,50	
C) EGF-colorante 8b	C1P0	1,08	14,08	21,73	0,65	0,70
		0,98	15,13	20,49	0,74	
D) C225 + EGF-colorante 8b	C ₁ P2	2,27	15,43	39,49	0,39	0,38
		1,99	13,71	37,86	0,36	

Conclusiones

45 Tal como se muestra en la presente memoria, la sonda EGF-colorante 8b es específica y sensible con respecto a las líneas celulares de cáncer de próstata PC3M-LN4 y 22Rv1, tanto in vitro como in vivo. Esta sonda también es útil para otros tipos de cáncer, ya que el receptor de EGF aumenta en muchos modelos de tumores.

Ejemplo 13

50 A. Materiales y métodos

A ratones NOD/SCID macho de seis semanas de edad se les inyectaron ortotópicamente 10⁵ células tumorales. Se evaluaron dos líneas de células tumorales humanas de próstata: PC3M-LN4, una línea celular altamente oncogénica y metastásica, y células 22Rv1, no caracterizadas anteriormente en este sistema modelo. El biomarcador, EGF-colorante 8b, se utilizó para la detección de tumores. En la semana 1 tras la implantación de las células tumorales, se inyectó 1 nmol de conjugado de colorante a través de la vena caudal. El progreso temporal de la eliminación del

colorante mediante la relación señal a ruido (SNR) como lectura estableció la máxima especificidad a las 96 horas. Se recogieron imágenes semanalmente durante cinco semanas 96 horas después de la inyección de colorante. Se incluyó una provocación competitiva en la que se utilizó el anticuerpo bloqueante C225 anti-receptor de EGF para confirmar la especificidad de la sonda en los tumores de próstata y los ganglios linfáticos.

5 Se obtuvieron imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano de animales vivos anestesiados con isoflurano con un prototipo de generador de imágenes LI-COR® Biosciences para animales pequeños (Lincoln, Nebraska). Se obtuvieron imágenes y se analizaron con el software Wasabi de Hamamatsu Fotonics (Hamamatsu, Japón).

10 Al final del estudio, se obtuvieron imágenes de los tumores, que se extirparon, se pesaron, se les midió el calibre y se prepararon secciones tisulares.

B. Resultados y conclusión

15 Cuando se lleva a cabo un procedimiento de formación de imágenes del crecimiento de un tumor interno en un estudio longitudinal, una preocupación importante es la capacidad de seguir y estimar correctamente el tamaño del tumor. La figura 7 (tumor PC3M-LN4) y la figura 8 (tumor 22Rv1) muestran los resultados para un animal observado a lo largo del período del experimento. Por consiguiente, sólo los píxeles que igualaban o excedían la SNR estándar en la región de interés se incluyeron en la estimación del tamaño del tumor a lo largo del tiempo. Se determinaron el área (mm²), la intensidad de la señal del tumor por mm² y la SNR de pico. Estos parámetros mostraron tendencias similares a lo largo del tiempo para las dos líneas celulares de tumor de próstata. El crecimiento tumoral se controló eficazmente con EGF-colorante 8b en el modelo de tumor ortotópico con profundidades de tumor de hasta 1 cm.

20 Cuando se compararon el volumen (mm³), el peso (mg) y la SNR para el tumor, el grupo de tratamiento de 22Rv1 mantuvo una media más alta en todas las categorías de análisis en comparación con los tumores PC3M-LN4 (figura 9, A, B y C respectivamente).

25 Se obtuvo una confirmación adicional de la especificidad de EGF-colorante 8b para los tumores de próstata mediante la recuperación de los tumores y los ganglios linfáticos al finalizar el estudio.

30 El análisis mostró que, cuando se administraba C225, un anticuerpo monoclonal que bloquea el receptor de EGF, 24 horas antes del EGF-colorante 8b, se alcanzaba aproximadamente el 39% de bloqueo (figura 10). La deposición del EGF-colorante 8b en todo el tumor se pudo observar en las dos secciones que recibieron biomarcador marcado.

35 Un objetivo principal de este estudio fue determinar la afectación de los ganglios linfáticos con las dos líneas celulares y evaluar el EGF-colorante 8b como indicador de metástasis. Se sabe que la línea PC3M-LN4 produce metástasis en los ganglios linfáticos paraaórticos, mientras que la línea 22Rv1 no estaba caracterizada. Al finalizar el estudio, se formaron imágenes de los tumores de próstata y las regiones de los ganglios linfáticos en las cavidades abdominales abiertas. No se observaron crecimiento ni signos de metástasis para los animales con tumores de próstata 22Rv1, a pesar de que dichos tumores eran, en promedio, 3 veces mayores en peso y volumen que los tumores de próstata PC3MLN4. Los ganglios linfáticos de los animales con tumores de próstata PC3MLN4 aparecieron ampliados y opacos, y visualmente presentaban las características típicas de metástasis. Al obtener imágenes de los ganglios linfáticos en un abdomen abierto con un tumor de próstata grande, la señal de los ganglios linfáticos, aunque se detecta, está amortiguada por la elevada señal de la región. Sin embargo, si el tumor se extirpa o se cubre, la señal de los ganglios linfáticos se observa claramente.

45 Los ganglios linfáticos de los animales provocados se extirparon y se escanearon en un equipo Odyssey a fin de confirmar la presencia de EGF-colorante 8b en los ganglios linfáticos paraaórticos de los animales PC3M-LN4. Aunque los ratones que recibieron las células 22Rv1 desarrollaron tumores de próstata grandes, no mostraron signos de metástasis en los ganglios linfáticos a la semana 6. Los ganglios PC3MLN4 extirpados se analizaron en Odyssey y se determinó la señal por unidad de superficie (mm²). Las comparaciones de los ganglios linfáticos procedentes de tratamientos con EGF-colorante 8b y C225 + EGF-colorante 8b mostraron aproximadamente un 34% de bloqueo en los ganglios linfáticos en comparación con el 39% observado en los tumores de próstata. Estos resultados sugieren que el efecto del C225 se extiende al sitio de metástasis, lo que confirma la especificidad del biomarcador con este sistema de modelo de tumor.

	Canal	Intensidad	Área, mm ²	Señal/área, mm ²	% bloqueado
NC	700	0,15	10,63	0,014	
	800	0,16	10,63	0,015	
EGF-colorante 8b	700	0,14	6,26	0,022	
	800	7,20	6,26	1,150	
C225+	700	0,07	3,91	0,018	
	800	2,98	3,91	0,762	33,74

Ganglios linfáticos de los animales positivos (tumores derivados de PC3M-LN4) junto con un ganglio de control negativo (izquierda). El color verde representa la señal del canal de 800 nm, y el rojo representa la señal del canal

de 700 nm (autofluorescencia y fondo).

Conclusiones

- 5 A diferencia de los tumores PC3M-LN4, los tumores 22Rv1 no mostraron metástasis espontánea a los ganglios linfáticos paraaórticos, incluso con presencia de grandes tumores de próstata. La utilización del biomarcador EGF-colorante 8b y de la formación de imágenes por fluorescencia óptica no invasiva permite hacer un seguimiento del tamaño del tumor en los tumores abdominales profundos, así como en los ganglios linfáticos, lo que confirma las metástasis y proporciona al investigador una confirmación inmediata sin la necesidad de examen histológico. El antagonismo de la señal *in vivo* por el anticuerpo C225 confirma la especificidad del biomarcador EGF-colorante 8b.

Ejemplo 14

15 La formación de imágenes *in vivo* de sondas moleculares específicas, o formación de imágenes moleculares, es un campo emergente para el estudio de modelos animales de cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. La formación de imágenes ópticas utilizando sondas de direccionamiento o trazadores marcados con fluorescencia es particularmente adecuada para la formación de imágenes moleculares, ya que las sondas fluorescentes son inocuas, sensibles y pueden conjugarse específicamente con moléculas pequeñas, anticuerpos, péptidos y proteínas. La formación de imágenes ópticas puede controlar el crecimiento y la regresión de tumores de un modo continuo y no invasivo. Los fluoróforos con emisiones en la región visible del espectro tienen graves limitaciones de sensibilidad debidas al fondo autofluorescente de los tejidos y la sangre. Los agentes de fluorescencia más útiles han demostrado ser los que presentan emisiones comprendidas entre 780 nm y 850 nm (véase Weissleder, Nature Biotechnology, vol. 19, p. 316-317 (2001)). Dado que los espectros de absorbancia de los fluidos y tejidos corporales exhiben mínimos locales en la región del infrarrojo cercano (IR cercano), la formación de imágenes en el infrarrojo cercano ofrece las ventajas de una penetración relativamente profunda en el tejido y una autofluorescencia baja.

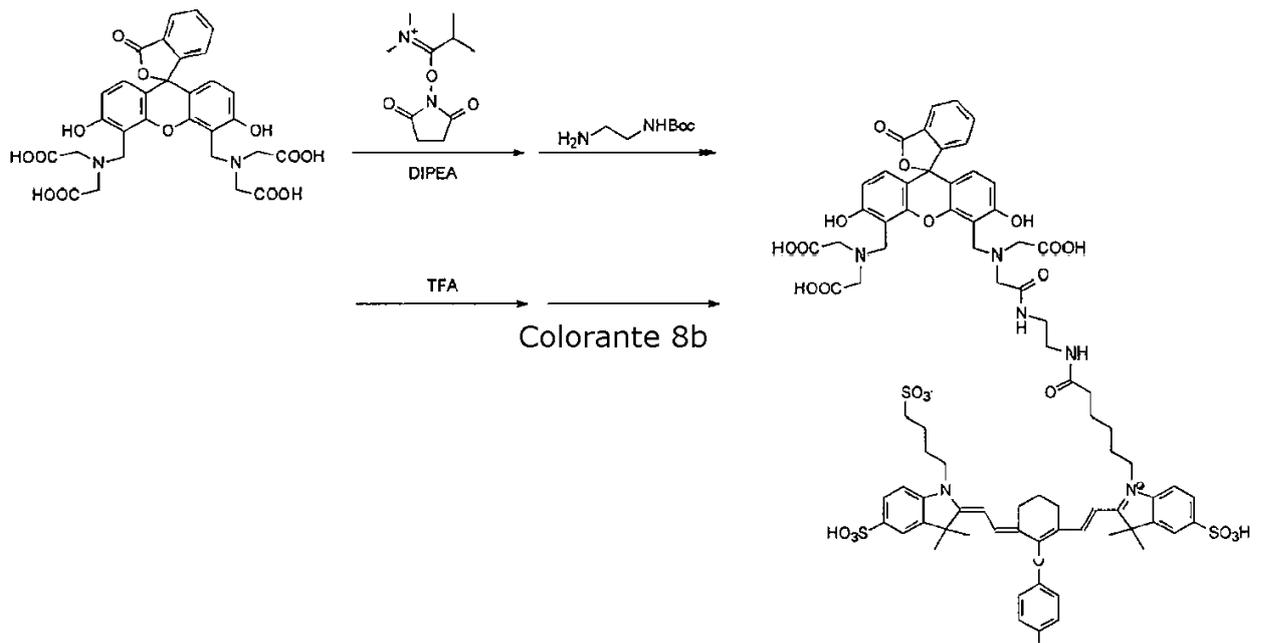
30 Las ventajas de disponer de un marcador óseo o un compuesto que pueda introducirse activamente en el hueso durante la remodelación y la resorción proporcionarían puntos de referencia para otros agentes de formación de imágenes (una radiografía óptica, si se quiere) o para la investigación dedicada a las metástasis osteoblásticas. El agente de direccionamiento también puede beneficiar a los que se encargan de evaluar sitios de lesión mecánica, que pueden poner al descubierto sitios de unión para el agente. Sin embargo, la mineralización ósea ofrece el mayor número de sitios de unión para el agente de direccionamiento. Algunos colorantes son capaces de unirse durante la calcificación ósea, como tetraciclinas o derivados de fluoresceína verde, tales como calceína o DCAF, entre otros. Los presentes solicitantes han utilizado un fluorocromo conocido (calceína, excitación a 488 nm y emisión a 520 nm) y lo han marcado con el colorante 8b del ejemplo 8 para alcanzar dos objetivos: 1) incorporar el compuesto en el hueso en crecimiento activo y desplazar la detección del compuesto en la región del IR cercano para aprovechar la mayor sensibilidad de detección, y 2) producir un compuesto marcado dualmente para una mayor versatilidad.

40 B. Síntesis

- 1) El material de partida, la calceína, se adquirió como un único isómero puro y uno de sus grupos carboxilato se activó por TSU en presencia de DIPEA en DMSO.
- 45 2) A continuación, el grupo carboxilato activado de éster de NHS se conjugó con etilendiamina (EDA) protegida con Boc para generar una amina primaria potencial que porta el derivado de calceína.
- 3) El grupo protector Boc se eliminó con TFA para liberar la amina primaria de la calceína-EDA. Y este precursor, calceína-EDA, se purificó por HPLC antes de la conjugación final con el colorante 8b.
- 50 4) El marcador óseo final (calceína-colorante 8b) se obtuvo por conjugación de la calceína-EDA anterior con colorante 8b de éster de NHS en una razón molar de uno a uno. Este producto se purificó adicionalmente por HPLC para eliminar el ácido libre de colorante 8b y la calceína-EDA. Tras la purificación por HPLC, el producto se secó en un evaporador Speed Vac a temperatura ambiente y a continuación se almacenó en un congelador a -20°C hasta su utilización.
- 55

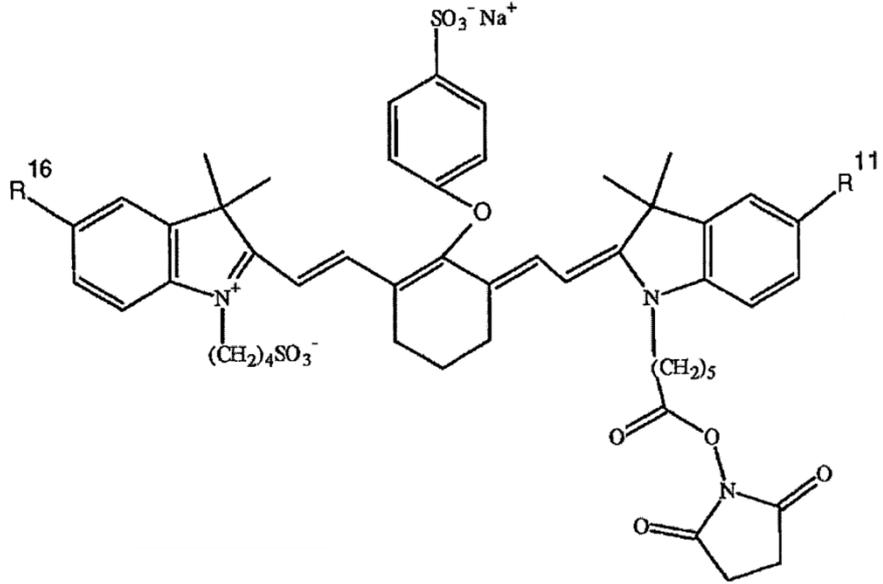
Se realizó un seguimiento de la síntesis por HPLC y espectrometría de masas durante todo el proceso. Los procedimientos anteriores se pueden resumir en el siguiente esquema de síntesis (el producto indicado es una mezcla de isómeros).

60



REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:

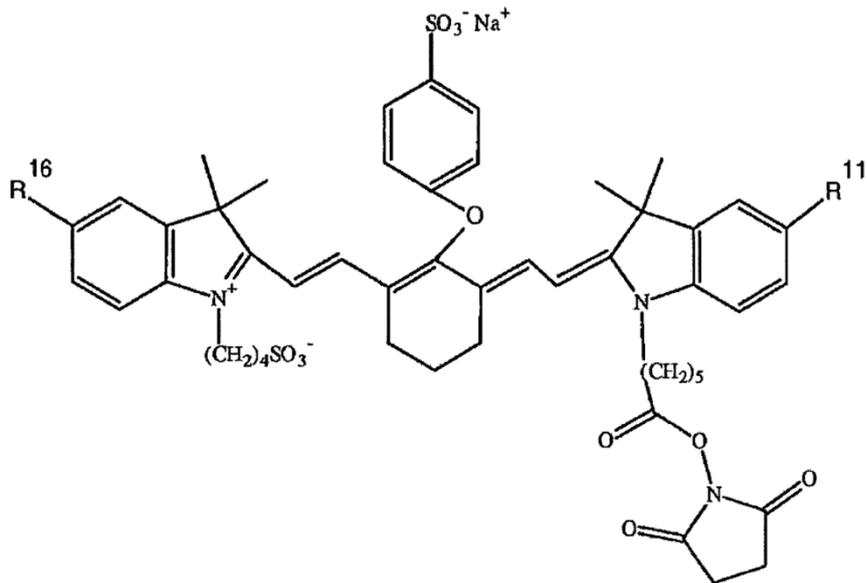


5

en el que

- 10
- (1) R¹¹ es F, y R¹⁶ es F; o
- (2) R¹¹ es H, y R¹⁶ es SO₃⁻Na⁺; o
- (3) R¹¹ es SO₃⁻Na⁺, y R¹⁶ es H; o
- 15
- (4) R¹¹ es H, y R¹⁶ es F; o
- (5) R¹¹ es F, y R¹⁶ es H; o
- 20
- (6) R¹¹ es SO₃⁻Na⁺, y R¹⁶ es F; o
- (7) R¹¹ es F, y R¹⁶ es SO₃⁻Na⁺;

2. Compuesto de fórmula:



25

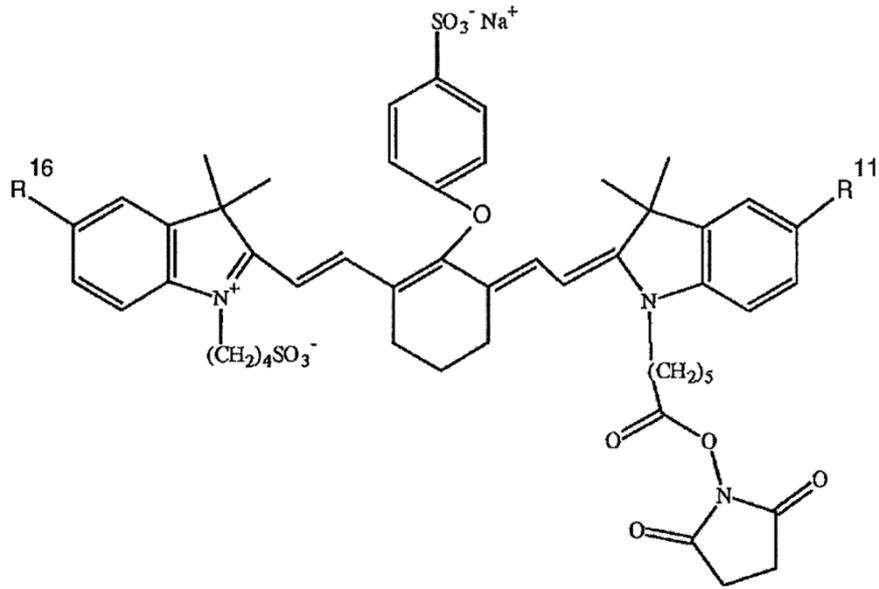
en el que

- 5 a) R^{11} es H, y R^{16} es H; o
- b) R^{11} es $SO_3^-Na^+$, y R^{16} es $SO_3^-Na^+$; o
- c) R^{11} es F, y R^{16} es F; o
- 10 d) R^{11} es H, y R^{16} es $SO_3^-Na^+$; o
- e) R^{11} es $SO_3^-Na^+$, y R^{16} es H; o
- 15 f) R^{11} es H, y R^{16} es F; o
- g) R^{11} es F, y R^{16} es H; o
- h) R^{11} es $SO_3^-Na^+$, y R^{16} es F; o
- 20 i) R^{11} es F, y R^{16} es $SO_3^-Na^+$;

para su utilización en un procedimiento de formación de imágenes ópticas *in vivo*,

- 25 - en el que la formación de imágenes es una formación de imágenes de tumores; o
- en el que la formación de imágenes es el diagnóstico de placas ateroscleróticas o coágulos sanguíneos; o
- en el que la formación de imágenes está destinada a
- 30 (1) las enfermedades oculares en oftalmología;
- (2) las enfermedades de la piel;
- 35 (3) las enfermedades o los tumores gastrointestinales, bucales, bronquiales, cervicales o urinarios mediante endoscopia;
- (4) las placas ateroscleróticas u otras alteraciones vasculares a través de catéteres endoscópicos flexibles;
- 40 (5) los tumores de mama mediante reconstrucción de imágenes en 2D o 3D; o
- (6) los tumores cerebrales, la perfusión o el accidente cerebrovascular mediante reconstrucción de imágenes en 2D o 3D; o
- 45 - el procedimiento comprende verificar la existencia de células cancerosas o tejidos cancerosos mediante el marcado de un anticuerpo, péptido, polipéptido, proteína, ligando para receptores de la superficie celular o una molécula pequeña, con el compuesto colorante y, administrar a continuación el conjugado de colorante al sujeto para la detección y la formación de imágenes del tumor.

50 3. Compuesto de fórmula:



en el que

- 5 (1) R^{11} es F, y R^{16} es F; o
 (2) R^{11} es H, y R^{16} es $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$; o
 10 (3) R^{11} es $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$, y R^{16} es H; o
 (4) R^{11} es H, y R^{16} es F; o
 (5) R^{11} es F, y R^{16} es H; o
 15 (6) R^{11} es $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$, y R^{16} es F; o
 (7) R^{11} es F, y R^{16} es $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$;

20 para su utilización en un procedimiento de formación de imágenes ópticas *in vivo*, en el que la formación de imágenes es una formación de imágenes tomográficas de órganos, una monitorización de funciones de órganos, una angiografía coronaria, una endoscopia de fluorescencia, una cirugía guiada por láser o un procedimiento fotoacústico o de sonofluorescencia.

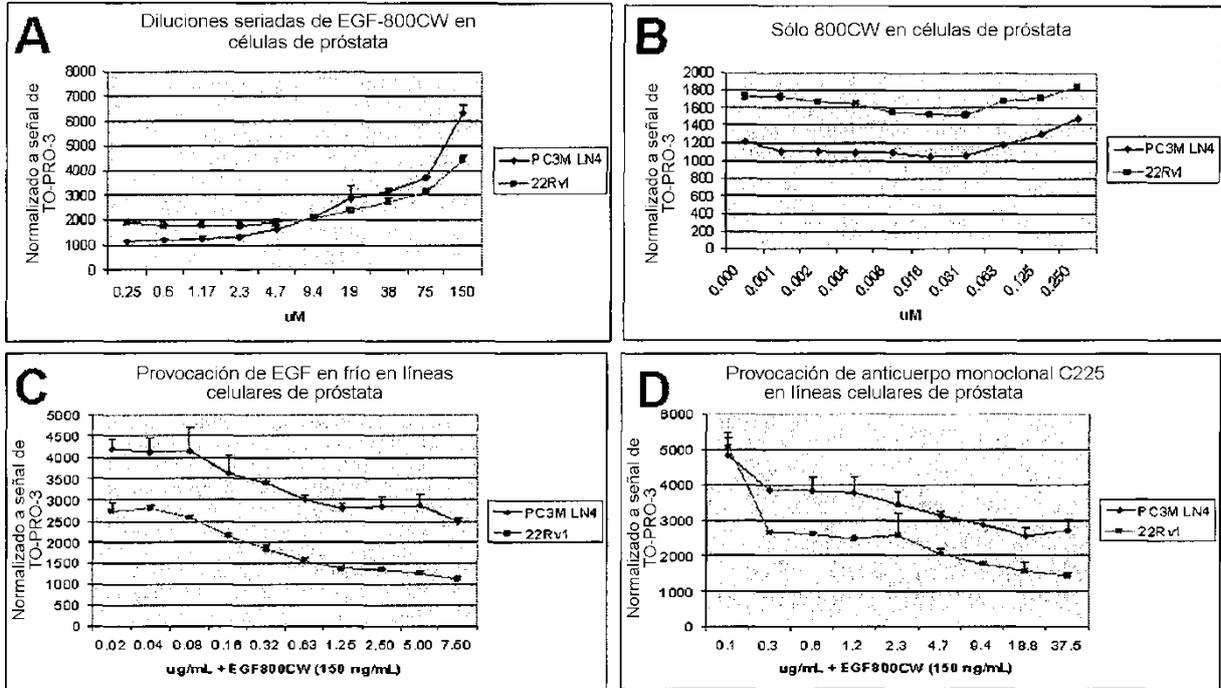


Fig. 1

Análisis de sección de tejido prostático

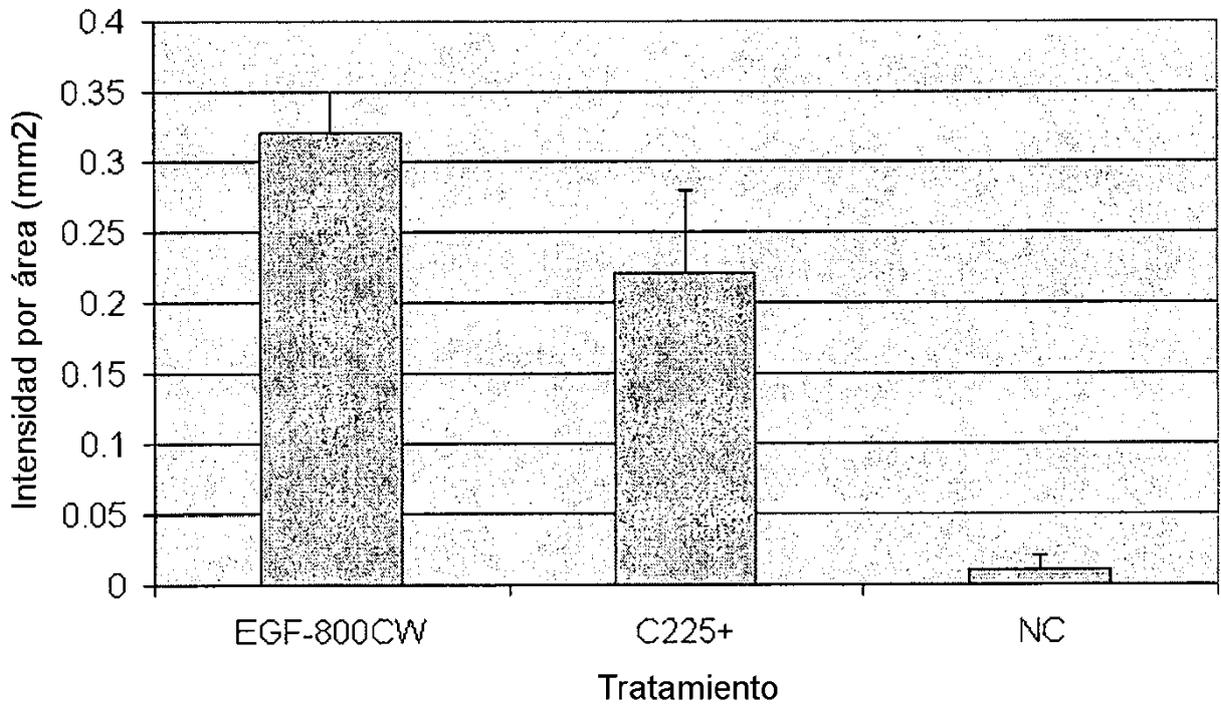


Fig. 2

Crecimiento de tumor abdominal PC3M-LN4 a lo largo de 6 semanas

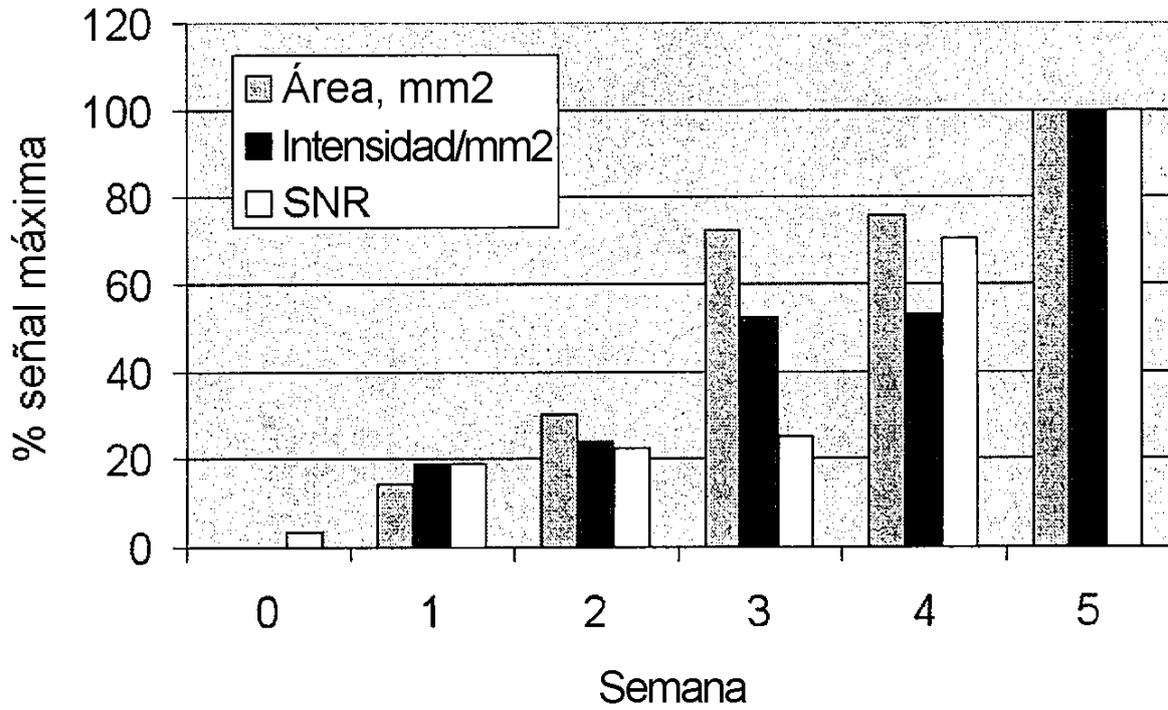


Fig. 3

Crecimiento de tumor abdominal
22Rv1 a lo largo de 6 semanas

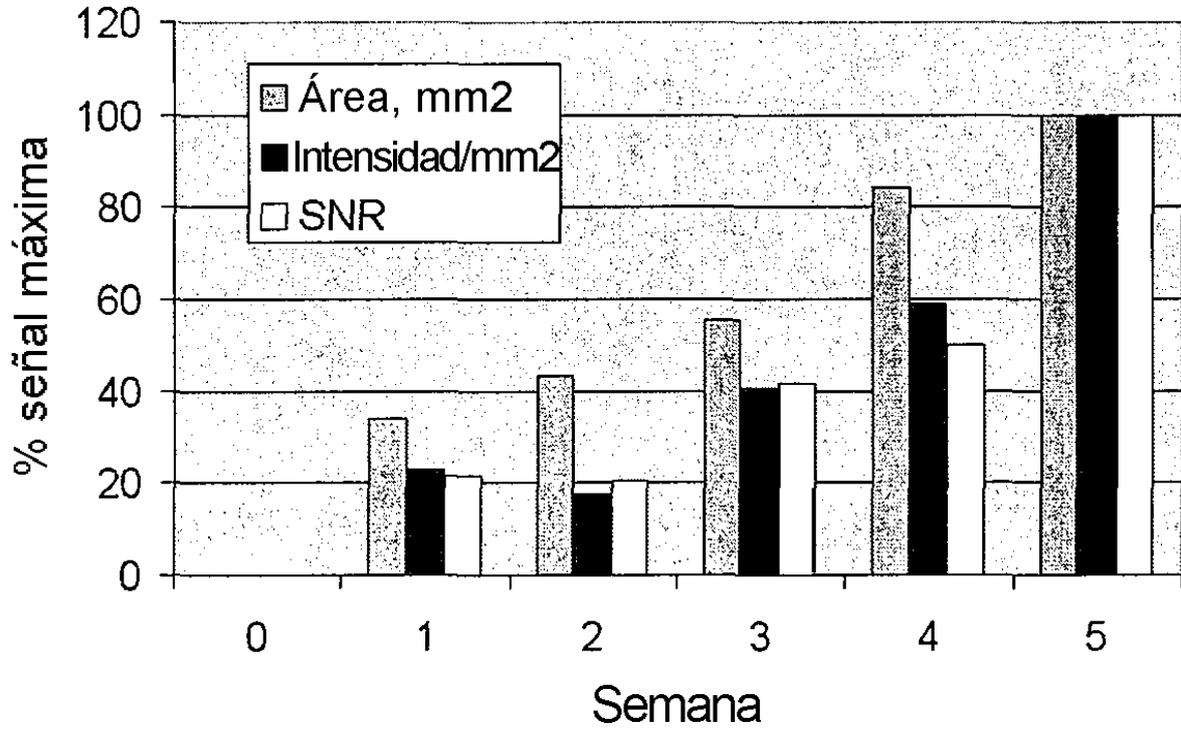


Fig. 4

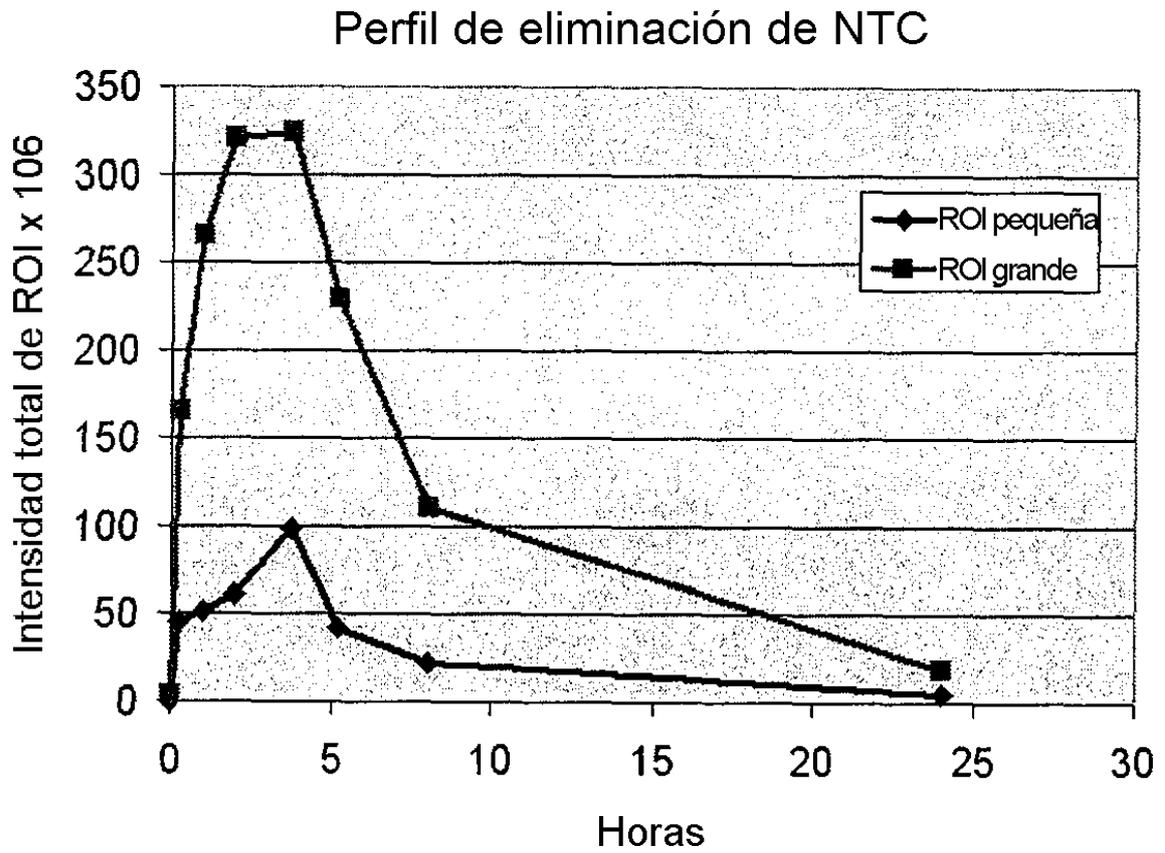


Fig. 5

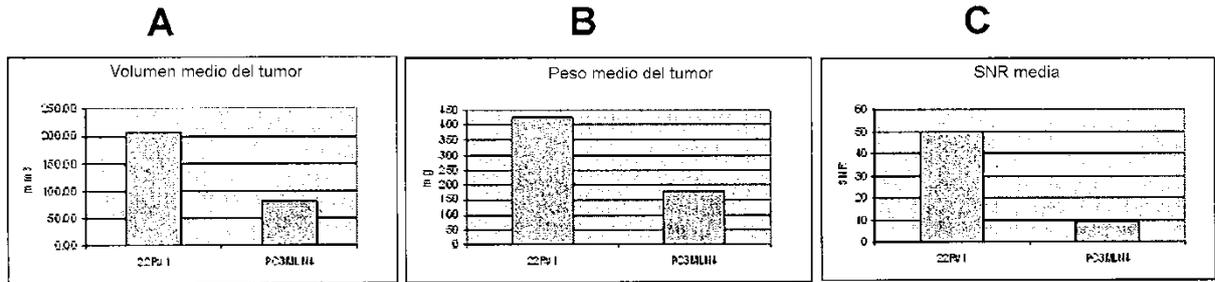


Fig. 6

Eliminación de EFG-IRDye800CW en tumor subcutáneo (células PC3M-LN4)

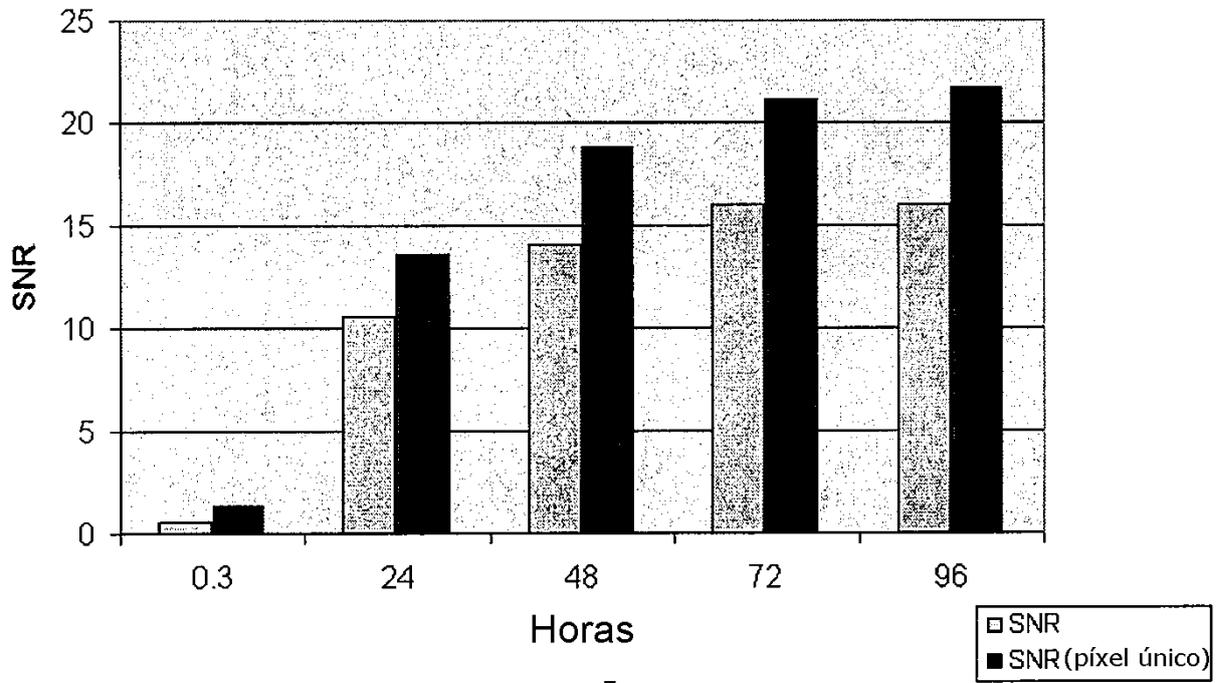


Fig. 7