(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 588 514**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2012 PCT/EP2012/053255**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12116949**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2012 E 12709822 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2681334**

(54) Título: **Aplicación de puntos cuánticos para la tinción nuclear**

(30) Prioridad:

28.02.2011 US 201161464217 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2016

(73) Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 Innovation Park Drive
Tucson AZ 85755, US

(72) Inventor/es:

YUN, CHOL, S.;
KELLY, BRIAN, D.;
ASHWORTH-SHARPE, JULIA;
BIENIARZ, CHRISTOPHER;
BAMFORD, PASCAL y
MURILLO, ADRIAN, E.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Aplicación de puntos cuánticos para la tinción nuclear

Campo

La presente invención se refiere, en general, a un sistema y método para la tinción nuclear en muestras de tejido. Pueden obtenerse determinaciones nucleares cuantitativas de muestras de patologías examinadas al microscopio de fluorescencia. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para determinar simultáneamente la morfología y textura nuclear con otros ensayos de detección múltiple sobre el mismo portaobjetos.

Antecedentes

La determinación de las características nucleares mediante análisis de imagen automatizado es una potente estrategia en la detección, diagnóstico y pronóstico de diversos estados de la enfermedad. Estas características han incluido tradicionalmente la morfología, ploidía, textura y aspectos contextuales. Una de las realizaciones de más éxito de esta tecnología se ha aplicado al cribado masivo del cáncer de cuello de útero en forma de sistemas comerciales de generación de imágenes de Hologic™ (el ThinPrep® Imaging System) y Becton, Dickinson and Company (FocalPoint™). Otros sistemas comerciales incluyen OralAdvance™ y LungSign™, de Perceptronix Medical Inc. Laboratories, para la detección precoz del cáncer oral y de pulmón, respectivamente.

La morfología nuclear se refiere en general, a determinaciones de forma y tamaño; tales como las que describen redondez del perímetro. La ploidía se aplica en general por medio de un protocolo estequiométrico de tinción (p. ej., tionina-Feulgen) para determinar recuento anómalo de cromosomas, denominado aneuploidía e implica la determinación de la densidad óptica integrada a lo largo del área nuclear. Los métodos de análisis de la textura se consideran en general, bien como estadísticos o bien como estructurales. Ambas estrategias producen medidas descriptivas de la variación espacial y de densidad de la estructura interna o del patrón de cromatina de un núcleo. Por último, los aspectos contextuales miden la distribución espacial de los ordenamientos internucleares dentro de la estructura de un tejido.

Todos estos métodos se han aplicado de forma individual y en combinación para discriminar con éxito entre normal y patología anómala en diversos tipos de tejido. Aunque el enfoque de este trabajo se ha aplicado en general a la generación de imágenes de campo claro, también se ha llevado a cabo alguna investigación sobre la evaluación de dichas estrategias en la microscopía de fluorescencia.

Sin embargo, los fluoróforos tradicionales sufren varios problemas que reducen su utilidad en la aplicación de dichas técnicas a esta modalidad. El fotoblanqueo es un problema clave que degrada la señal de la muestra a lo largo de tiempo, incluso en el intervalo de tiempo necesario para la captura de la imagen. La sensibilidad y especificidad a las moléculas diana (p. ej., ADN) es también un factor limitante en las metodologías de tinción tradicionales. Por ejemplo, el colorante de contraste nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ampliamente utilizado, es útil para localizar la posición y forma de los núcleos celulares, pero no se une de forma específica para reproducir una textura nuclear interpretable. Otros colorantes fluorescentes usados como colorantes de contraste y marcadores de ADN incluyen los colorantes de Hoechst (p. ej., Hoechst 33258 y Hoechst 33342) y yoduro de propidio. Estos materiales, sin embargo, sufren degradación de la intensidad de fotoluminiscencia y cambio espectral fotoinducidos.

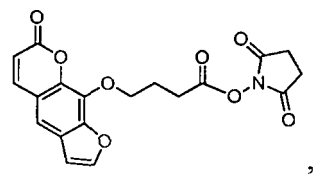
La técnica previa existente en el uso de los colorantes fluorescentes como colorantes y marcadores de ADN utiliza complejos orgánicos e inorgánicos y orgánicos de moléculas pequeñas. La aplicación de un sistema de tinción de contraste basado en nanomateriales proporciona un medio para superar los errores inherentes al uso de fluoróforos de moléculas pequeñas debido a sus características ópticas fotoestables. Los nanomateriales de los puntos cuánticos se han usado en su mayoría para detectar ADN usando sistemas basados en FRET (siglas en inglés de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) o TEF (transferencia electrónica fotoinducida). (Dubertret, Nature Materials (2005), 4(11): 797-798.) Otra aplicación que emplea nanomateriales es el uso de puntos cuánticos conjugados con sondas a base de ácido nucleico que pueden hibridar con sus secuencias de ADN complementario diana. (Bentolila et al., Cell Biochemistry and Biophysics (2006), 45(1):59-70.) El punto cuántico actúa como un indicador visual para las secuencias diana. Sin embargo, la aplicación de dicho colorante no es compatible con los ensayos de FISH (siglas en inglés de hibridación *in situ* fluorescente) para TMPRSS-ERG y HER2 porque una sonda ADN marcado que puede unirse generalmente a las moléculas de ADN pueden hibridar con el gen diana, evitando así la hibridación de la sonda del gen diana y enmascarando la presencia del gen diana. El uso de puntos cuánticos con moléculas que interaccionan con el ADN para teñir ADN nuclear en células y tejidos fijados no se ha publicado en la bibliografía científica.

Sumario

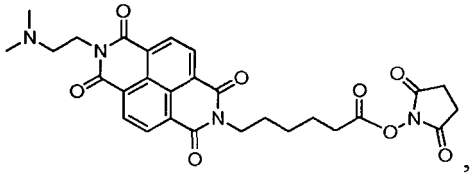
Se desvelan realizaciones de conjugados de nanopartícula/resto de unión a ADN y métodos para usar los conjugados para visualizar un núcleo. También se desvelan *kits* para realizar el método.

Las realizaciones del conjugado incluyen una nanopartícula (p. ej., un punto cuántico, una nanopartícula metálica, una nanopartícula de óxido metálico, una nanopartícula de complejo de metal de transición) y un resto de unión a ADN que comprende una molécula de unión a ADN y un engarzador (p. ej., una cadena alifática o polialquilenglicol) tales que el conjugado tiene la estructura nanopartícula-engarzador-molécula de unión a ADN. Las realizaciones particulares que se desvelan se refieren a un conjugado que comprende un punto cuántico y un resto de unión a ADN que comprende una molécula de unión al ADN. La molécula de unión a ADN puede ser un agente de unión al surco menor, un agente de unión al surco mayor, un intercalante de ADN, un agente alquilante de ADN, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de unión al ADN es 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), colorantes de bis-bencimida, psoraleno, o naftalendiimida.

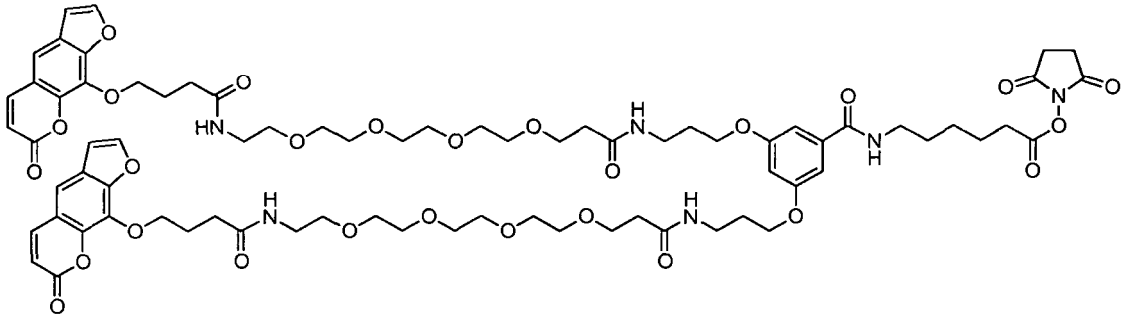
En realizaciones particulares, el resto de unión a ADN incluye un engarzador multifuncional y una pluralidad de agentes de unión al surco menor, intercalantes de ADN, agentes alquilantes del ADN, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, el engarzador multifuncional puede comprender dos cadenas de polietilenglicol unidas a un éster de *N*-hidroxisuccinimida y una molécula de unión al ADN se une a cada cadena de polietilenglicol. En realizaciones particulares, el resto de unión al ADN se selecciona entre



,

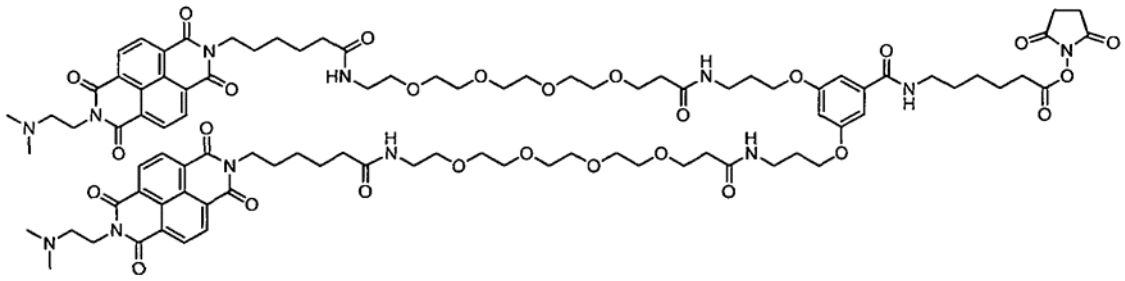


,



Bis-psoraleno

o



Bis-NDI-C6.

El núcleo se visualiza pretratando una muestra de tejido, tal como una muestra de tejido fijado, con una proteasa para permeabilizar el núcleo y después incubando la muestra de tejido pretratada con un conjugado de nanopartícula/molécula de unión al ADN. El conjugado entra en un núcleo y se une al ADN en el núcleo. La nanopartícula se visualiza después, visualizándose así el núcleo. En algunas realizaciones, la nanopartícula es un punto cuántico y la fluorescencia del punto cuántico se detecta para visualizar el núcleo.

El conjugado se incuba con la muestra de tejido a una concentración de al menos 5 nM, tal como al menos 25 nM o al menos 50 nM. Cuando la nanopartícula se visualiza, se obtiene una imagen del núcleo y pueden usarse técnicas informáticas y de análisis de imagen para determinar de forma cuantitativa aspectos nucleares tales como distribución cromosómica, ploidía, forma, tamaño, aspectos de la textura (p. ej., área superficial), aspectos contextuales (p. ej., distancia al límite nuclear) y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, se realizan uno o más procedimientos adicionales sobre la muestra de tejido. Por ejemplo, pueden aplicarse a la muestra de tejido y detectarse una o más sondas capaces de hibridar con una o más dianas dentro de la muestra de tejido. En algunos casos, la sonda hibridada se detecta visualizando un punto cuántico asociado con la sonda. Si el conjugado de nanopartícula/molécula de unión a ADN incluye un punto cuántico, el punto cuántico de la sonda se selecciona para emitir fluorescencia a una longitud de onda diferente de la del punto cuántico del conjugado. En realizaciones particulares, el procedimiento adicional es un procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente.

Los *kits* para llevar a cabo las realizaciones del método incluyen una composición enzimática de proteasa, un conjugado de nanopartícula/molécula de unión a ADN y un tampón de reacción. La composición enzimática de proteasa incluye una enzima proteasa en un tampón que tiene una concentración de sal y un pH suficientes para permitir que la enzima proteasa presente actividad proteolítica. El tampón de reacción tiene una concentración de sal y un pH suficientes para posibilitar que el conjugado entre en un núcleo dentro de una muestra de tejido pretratada con la composición enzimática de proteasa.

Lo anterior y otros objetos, aspectos, y ventajas de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que prosigue con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es un diagrama esquemático de un conjugado de molécula de unión a ADN-punto cuántico unido a ADN.
La fig. 2 es una fotografía a color, usando un filtro de DAPI, de una realización de un conjugado de molécula de unión a ADN-punto cuántico usado para la tinción de contraste de núcleos de tejido prostático.
Las figs. 3A-B son fotografías de núcleos celulares con tinción de contraste con un conjugado de punto cuántico-DAPI (fig. 3A) y DAPI (fig. 3B).
La fig. 4 es una fotografía que ilustra núcleos de tejido epitelial con tinción de contraste con un conjugado de punto cuántico-psoraleno (QD490PEG-NH-psoraleno).
La fig. 5 es una fotografía que ilustra núcleos de tejido prostático con tinción de contraste con un conjugado de punto cuántico-naftalendiimida (QD490:NDI-C6).
La fig. 6 es una fotografía que ilustra la tinción de contraste de núcleos de tejido prostático con conjugado de QD490:NDI-C6 en conjunto con un ensayo de FISH utilizando una sonda de TMPRSS2 que contiene los puntos cuánticos QD565 y QD655.
La fig. 7 es una fotografía que ilustra la tinción de contraste de núcleos de tejido prostático con conjugado de QD490:NDI-C6 en conjunto con un ensayo de FISH utilizando una sonda de HER2-CHR17 que contiene los puntos cuánticos QD565 y QD655.
La fig. 8 es una fotografía que ilustra la tinción de contraste de núcleos de tejido prostático con conjugado de QD490:NDI-C6 en conjunto con un ensayo de FISH utilizando sondas de TMPRSS2, ERG5'3', SLC45A3, y ETV1 conjugadas con los puntos cuánticos QD565, QD585, QD605 y QD655, respectivamente.
La fig. 9 es un esquema sintético para añadir restos de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) a moléculas de unión a ADN en los que los R_1 y R_2 son independientemente una cadena alifática sustituida o sin sustituir, aromática sustituida o sin sustituir, heteroaromática, o un polialquilheteroátomo tal como una cadena de óxido de alquileno (p. ej., un polialquilenglicol).
La fig. 10 representa una reacción entre un éster succinimidilo de un resto de unión al ADN y un grupo amina libre en un punto cuántico, produciendo así un conjugado de punto cuántico-resto de unión al ADN.
La fig. 11 es un espectro de fluorescencia de una mezcla de puntos cuánticos que emiten fluorescencia a 490 nm, 565 nm, y 655 nm.
La fig. 12 es una fotografía de células de tejido prostático después de realizar un ensayo de TMPRSS2. Los núcleos se han sometido a tinción de contraste con un conjugado de QD490:NDI-C6 a una concentración de 25 nM. Las sondas de FISH que utilizan los puntos cuánticos QD565 y QD655 también son claramente visibles.
La fig. 13 es una fotografía de células de tejido mamario después de realizar un ensayo de HER2-Chrl7. Los núcleos se han sometido a tinción de contraste con un conjugado de QD490:NDI-C6 a una concentración de 25 nM. Las sondas de FISH que utilizan los puntos cuánticos QD565 y QD655 también son claramente visibles.
La fig. 14 es una imagen de campo oscuro de tejido prostático. Los núcleos se han sometido a tinción de contraste con un conjugado de QD490:NDI-C6 a una concentración de 25 nM.
La fig. 15 es una tinción de tejido de hematoxilina y eosina en campo pseudo claro producida convirtiendo la imagen de campo oscuro de la fig. 14. La imagen tiene un aumento de 40X.
La fig. 16 es una fotografía de tejido pulmonar teñido con un conjugado de QD490-NDI-C6.
La fig. 17 es una fotografía de tejido de cuello de útero teñido con un conjugado de QD490-NDI-C6.
La fig. 18 es el espectro de RMN ^{1}H del compuesto (11), esquema 4.
La fig. 19 es el espectro de RMN ^{13}C del compuesto (11), esquema 4.

Descripción detallada

En general, la presente divulgación tiene que ver con un sistema y un método mejorados para reproducir y determinar características nucleares en la microscopía de fluorescencia. Es de particular interés la capacidad de

reproducir la textura nuclear de una manera que anteriormente solo había sido posible en modalidades de campo claro. Además, las realizaciones del sistema y del método que se desvelan no intervienen con protocolos de tinción adicionales, posibilitando así la determinación simultánea de múltiples fuentes de información a partir del mismo tejido.

Las determinaciones de la textura nuclear pueden clasificarse ampliamente en las siguientes áreas: 1) estadística descriptiva de la distribución de la cromatina; 2) aspectos de la textura discretos; 3) valores extremos; 4) markoviana; 5) longitud de serie y 6) aspectos de textura fractal. Todas estas estrategias necesitan alta sensibilidad, especificidad y contraste de tinción del patrón de la cromatina (heterocromatina y eucromatina) dentro del núcleo celular. Estos métodos determinan y describen la forma en la que varía la intensidad de la imagen con la distribución espacial. Por ejemplo, la tinción nuclear relativamente uniforme, tal como DAPI, resulta en escasa o nula información de la textura, mientras que una tinción de tionina-Feulgen de campo claro resulta en un alto nivel de información de la textura que puede usarse para discriminar entre normal y patología anómala.

Una propiedad deseable adicional de una metodología de tinción para el examen nuclear es la estequiometría, la cual se refiere a una correlación directa entre el contenido de ADN y la intensidad de la tinción. La estequiometría permite un análisis de la ploidía consistente por medio del cual son detectables conjuntos cromosomas anómalos. Un defecto de los colorantes de contraste nucleares fluorescentes tradicionales tales como DAPI es que no son intrínsecamente estequiométricos e incluso se decoloran en condiciones de fotoblanqueo, separando además la correlación entre moléculas diana e intensidad de la imagen.

La presente divulgación proporciona una combinación de indicadores ópticos y sondas de interacción con el ADN que permiten la visualización y determinación preferentes de la estructura y contenido de ADN. Se desvelan realizaciones de restos de unión a ADN conjugados con nanomateriales. Los restos de unión a ADN comprenden al menos una molécula de unión a ADN. Las moléculas de unión a ADN son capaces de dirigir y unir los nanomateriales al ADN en los núcleos celulares. La fig. 1 es un diagrama esquemático que representa un resto de unión a ADN y su nanomaterial conjugado (p. ej., un punto cuántico) unido al ADN. También se desvelan realizaciones de un método para usar los conjugados de resto de unión a ADN/nanomaterial para definir el núcleo, delinear su límite y establecer su morfología en una célula. La fig. 2 es una imagen con filtro para DAPI de una realización de un conjugado de molécula de unión a ADN-punto cuántico usado para la tinción de contraste de núcleos de tejido prostático.

Las realizaciones de los nanomateriales desvelados, p. ej., puntos cuánticos, y restos de unión a ADN, proporcionan un medio para definir y delimitar los núcleos en el tejido. Los puntos cuánticos proporcionan una señal fluorescente fotoestable. Debido a la emisión fotoestable, los puntos cuánticos de amplio espectro de absorción (los espectros de absorción del punto cuántico abarcan las regiones superiores e inferiores del ultravioleta y pueden extenderse dentro de la región visible, dependiendo del tamaño de los puntos cuánticos), y de altos rendimientos cuánticos (p. ej., > 30 %, > 50 %, o incluso > 80 %), son fluoróforos superiores comparados con sus homólogos de molécula pequeña. Esto permite la tinción fluorescente de núcleos en el tejido en conjunto con ensayos de FISH tales como los ensayos de *HER2* y TMPRSS2-ERG fluorescentes.

Las moléculas de unión a ADN son orgánicas, inorgánicas y complejos de metales de transición que se unen al ADN mediante unión al surco mayor y/o menor, intercalación, unión a la cadena principal de fosfato y/o alquilación del ADN. Los diferentes agentes de unión a ADN dirigen cada uno el nanomaterial al ADN, pero la afinidad particular de cada agente de unión al ADN determina el perfil de tinción del ADN en el núcleo. El repertorio de agentes de unión a ADN permite una alta selectividad y regioselectividad molecular.

I. Términos y definiciones

Las siguientes explicaciones de términos y abreviaturas se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos habituales en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Tal como se usa en el presente documento, "que comprende/comprendiendo" significa "que incluye/incluyendo" y las formas del singular "un" o "una", o "el" o "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. El término "o" se refiere a un elemento individual de elementos alternativos enunciados o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

A menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia a la cual pertenece esta divulgación. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Otros aspectos de la divulgación son aparentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

A menos que se indique otra cosa, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, porcentajes, temperaturas, tiempos, y así sucesivamente, tal como se usan en la memoria descriptiva o las reivindicaciones se modifican mediante el término "alrededor de". Por consiguiente, a

menos que se indique otra cosa, de forma implícita o explícita, los parámetros numéricos expuestos son aproximaciones que pueden depender de las propiedades deseadas que se buscan y/o de los límites de detección en las condiciones/métodos de ensayo convencionales. Cuando se distingan de forma implícita o explícita realizaciones de la técnica previa que se discute, los números de la realización no son aproximados a menos que se citen las palabras "alrededor de".

Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, Genes VII, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al. (ed.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive DeskReference, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares. Las definiciones de términos comunes en química pueden encontrarse, por ejemplo, en Richard J. Lewis, Sr. (ed.), Hawley's Condensed Chemical Dictionary, publicado por John Wiley & Sons, Inc., 1997 (ISBN 0-471-29205-2).

Con el fin de facilitar la revisión de diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Alifático: Compuesto sustancialmente a base de hidrocarburo, o un radical del mismo (p. ej., C_6H_{13}, para un radical hexano), que incluye alcanos, alquenos, alquinos, incluyendo versiones cíclicas de los mismos, y que incluye además disposiciones de cadena lineales o ramificada y también todos los estereoisómeros e isómeros de posición. A menos que se manifieste expresamente otra cosa, un grupo alifático contiene de uno a veinticinco átomos de carbono; por ejemplo, de uno a quince, de uno a diez, de uno a seis, o de uno a cuatro átomos de carbono. La expresión "alifático inferior" se refiere a un grupo alifático que contiene de uno a diez átomos de carbono. Una cadena alifática puede ser sustituida o sin sustituir. A menos que se le denomine expresamente como "alifático sin sustituir" un grupo alifático puede ser, bien sustituido, o bien sin sustituir. Un grupo alifático puede estar sustituido con uno o más sustituyentes (hasta dos sustituyentes por cada carbono metileno en una cadena alifática, o hasta un sustituyente por cada carbono de un enlace doble -C=C- en una cadena alifática, o hasta un sustituyente para un carbono de un grupo metino terminal). Los sustituyentes alifáticos de ejemplo incluyen, por ejemplo, amina, amida, sulfonamida, halógeno, ciano, carboxi, hidroxi, mercapto, trifluorometilo, alquilo, alcoxi, alquiltio, tioalcoxi, arilalquilo, heteroarilo, alquilamino, dialquilamino, u otra funcionalidad.

Compuestos aromáticos o arilo son típicamente hidrocarburos cíclicos no saturados que tienen enlaces dobles y simples alternos. El benceno, un anillo de 6 carbonos que contiene tres enlaces dobles, es un compuesto aromático típico.

Bis es un prefijo que significa "dos veces" u "otra vez". Se usa en nomenclatura química para indicar que un grupo o radical químico aparece dos veces en una molécula. Por ejemplo, un *bis*-éster tiene dos grupos éster.

Combilexina: Una molécula que combina una cadena de poliamida de unión al surco menor, específica de secuencia con un intercalante.

Conjugado: Compuesto que tiene una nanopartícula, tal como un punto cuántico y una molécula acoplada de forma eficaz a la nanopartícula, bien de forma directa, o bien indirecta, mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la molécula puede estar acoplada a la nanopartícula de forma covalente o no covalente (p. ej., de forma electrostática). También es posible la unión indirecta de la molécula a la nanopartícula, tal como mediante el uso de un "engarzador", siempre que el engarzador no afecte negativamente a la luminiscencia del punto cuántico o a la función de la molécula. Los engarzadores moleculares conocidos en la técnica incluyen compuestos alifáticos, óxidos de alquileno, aminas primarias, tioles, estreptavidina, neutravidina, biotina, o compuestos similares.

Conjugar, unir, enlazar o ligar: Acoplar una primera unidad a una segunda unidad. Esto incluye, pero no se limita a, enlazar de forma covalente una molécula a otra molécula, enlazar de forma no covalente una molécula a otra molécula (p. ej., enlazar de forma electrostática) (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.921.496, que desvela métodos para la conjugación electrostática), enlazar de forma no covalente una molécula a otra molécula mediante enlace de hidrógeno, enlazar de forma no covalente una molécula a otra molécula mediante fuerzas de van der Waals y cualquiera o todas las combinaciones de dichos acoplamientos.

Tinción de contraste es un método de postratamiento de muestras después de que ya se han teñido con agentes para detectar una o más dianas, de modo que sus estructuras pueden visualizarse más fácilmente con un microscopio. Por ejemplo, se usa una tinción de contrasta de forma opcional antes de poner el cubreobjetos para conseguir una tinción inmunohistoquímica más nítida. Los colorantes de contraste difieren de un colorante primario en el color. Son bien conocidos numerosos colorantes de contraste, tales como hematoxilina, eosina, verde metilo, azul de metileno, Giemsa, azul Alcián, DAPI, y rojo nuclear rápido. En algunos ejemplos, pueden mezclarse entre sí uno o más colorantes para producir el colorante de contraste. Esto proporciona flexibilidad y la capacidad de elegir colorantes. Por ejemplo, puede seleccionarse un primer colorante para la mezcla que tenga un atributo particular, pero que, en cambio, no tenga un atributo deseado diferente. Puede añadirse un segundo colorante a la mezcla que presente el atributo deseado que falta. Por ejemplo, pueden mezclarse entre sí azul de toluidina, DAPI y azul celeste

de pontamina para formar un colorante de contraste.

Detectar: Determinar si un agente (tal como una señal o un antígeno, proteína o ácido nucleico particular) está presente o ausente, por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto puede incluir además la cuantificación y/o localización, por ejemplo, la localización dentro de una célula o compartimento celular particular. "Detectar" se refiere a cualquier método de determinar si algo existe o no existe, tal como determinar si una molécula diana está presente en una muestra biológica. Por ejemplo, "detectar" puede incluir usar un dispositivo visual o mecánico para determinar si una muestra presenta una característica específica. En ciertos ejemplos, detección se refiere a observar de forma visual una sonda unida a una diana, u observar que una sonda no se une a una diana. Por ejemplo, la microscopia óptica y otros medios de microscopía se usan normalmente para detectar precipitados cromogénicos para los métodos que se describen aquí.

Emisión o señal de emisión: Luz de una longitud de onda particular generada a partir de una fuente. En ejemplos particulares, se emite una señal de emisión a partir de un fluoróforo después de que el fluoróforo absorbe luz a su(s) longitud(es) de onda de excitación.

Excitación o señal de excitación: Luz de una longitud de onda particular necesaria y/o suficiente para excitar un electrón de transición a un nivel de energía superior. En ejemplos particulares, una excitación es la luz de una longitud de onda particular necesaria y/o suficiente para excitar un fluoróforo a un estado tal que el fluoróforo emitirá una longitud de onda de luz diferente (tal como más larga) que la longitud de onda de luz de la señal de excitación.

Fluorescencia es la emisión de radiación visible por un átomo o molécula que pasa de un estado electrónico superior a inferior, en la que el intervalo de tiempo entre la absorción y la emisión de energía es de 10^{-8} a 10^{-3} segundos. La fluorescencia se produce cuando el átomo o molécula absorbe energía de una fuente de excitación (p. ej., una lámpara de ultravioleta) y después emite la energía como radiación visible.

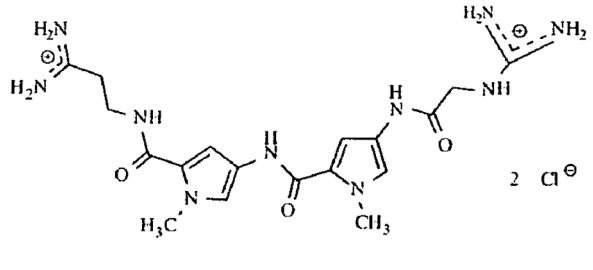
Hibridación *in situ* fluorescente (FISH): La FISH es una técnica que se usa para detectar y localizar la presencia o ausencia de secuencias de ADN específicas en los cromosomas. El FISH usa sondas fluorescentes que se unen solo a las partes del cromosoma con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia. El FISH también puede usarse para detectar secuencias de ARNm particulares dentro de las muestras de tejido.

Un grupo funcional es un grupo específico de átomos dentro de una molécula que es responsable de las reacciones químicas características de la molécula. Los grupos funcionales de ejemplo incluyen, sin limitación, alcano, alqueno, alquino, areno, halo (fluoro, cloro, bromo, yodo), epóxido, hidroxilo, carbonilo (cetona), aldehído, éster carbonato, carboxilato, éter, éster, peroxi, hidroperoxi, carboxamida, amina (primaria, secundaria, terciaria), amonio, imida, azida, cianato, isocianato, tiocianato, nitrato, nitrito, nitrilo, nitroalcano, nitroso, piridilo, fosfato, sulfonilo, sulfuro, tiol (sulfidrilo), disulfuro,

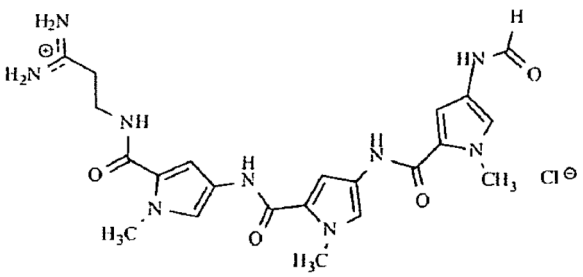
Compuestos heteroarilo son compuestos aromáticos que tienen al menos un heteroátomo, es decir, uno o más átomos de carbono en el anillo se han reemplazado con un átomo que tiene al menos un par libre de electrones, típicamente nitrógeno, oxígeno, o azufre.

Intercalación: Término que se refiere a la inserción de un material (p. ej., un ion o molécula) dentro de la microestructura de otro material. Por ejemplo, el psoraleno puede insertarse o intercalarse dentro del surco menor de una hélice de ADN bicatenario.

Lexitropsina: Miembro de una familia de análogos de los antibióticos naturales netropsina y distamicina.



Netropsina 1



Distamicina A 2

Engarzador: Molécula o grupo de átomos situada entre dos restos. Por ejemplo, un conjugado de punto cuántico-resto de unión a ADN puede incluir un engarzador entre el punto cuántico y una molécula de unión a ADN. Típicamente, los engarzadores son bifuncionales, es decir, el engarzador incluye un grupo funcional en cada extremo, en el que los grupos funcionales se usan para acoplar el engarzador a los dos restos. Los dos grupos

funcionales pueden ser los mismos, es decir, un engarzador homobifuncional, o diferentes, es decir, un engarzador heterobifuncional.

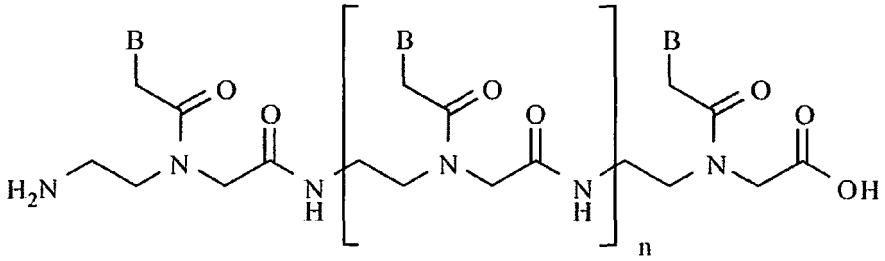
Resto: Un resto es un fragmento de una molécula, o una porción de un conjugado.

Detección múltiple: Detección de múltiples dianas en una muestra de forma sustancialmente simultánea o secuencial, según se desee, usando varios conjugados diferentes. La detección múltiple puede incluir identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos, generalmente ADN, ARN, péptidos, proteínas, tanto de forma individual como en cualquiera y en todas las combinaciones. La detección múltiple también puede incluir detectar dos o más de un gen, un mensajero y una proteína en una célula en su contexto anatómico.

Nanomaterial: Material con aspectos morfológicos y/o propiedades especiales procedentes de sus dimensiones nanométricas (es decir, que tienen una dimensión que es menor de 100 nm). Los nanomateriales están constituidos típicamente por nanopartículas. Las nanopartículas de un material dado pueden tener propiedades muy diferentes en comparación con partículas mayores del mismo material. Por ejemplo, las sustancias opacas pueden hacerse transparentes (p. ej., el cobre), los materiales inertes pueden hacerse catalíticos (p. ej., el platino, el oro), los materiales estables (p. ej., el aluminio) pueden hacerse combustibles, los aislantes pueden hacerse conductores (p. ej., la silicona), etc.

Nanopartícula: Partícula nanométrica con un tamaño que se mide en nanometros, por ejemplo, una partícula nanoscópica que tiene al menos una dimensión de menos de 100 nm. Los ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas metálicas, nanopartículas metaloides, nanopartículas de óxido metálico, materiales de tipo fulereno, nanotubos inorgánicos, dendrímeros (tales como con quelatos metálicos unidos de forma covalente), nanofibras, nanocuernos, nanocebollas, nanobastones, nanoprismas, nanocuerdas y puntos cuánticos Una nanopartícula puede producir una señal detectable, por ejemplo, a través de la absorción y/o emisión de fotones (incluyendo radiofrecuencia y fotones visibles) y resonancia de plasmón.

Ácido peptidonucleico: Polímero artificial que comprende una cadena principal de unidades de repetición de N-(2-aminoetil)glicina ligadas mediante enlaces peptídicos. Varias bases de purina y pirimidina, B, están ligadas a la cadena principal mediante enlaces metilencarbonilo.



Fotoblanqueo: Hacerse menos absorbente, reflectante o fluorescente tras la exposición a la luz; blanquearse o decolorarse mediante la exposición a la luz. El fotoblanqueo se refiere a la degradación o la destrucción fotoquímica de un fluoróforo.

Fotoestable: Estable frente al cambio fotoquímico. Tal como se usa en el presente documento, fotoestable significa que la señal detectable no disminuye a lo largo del tiempo con la exposición a la luz.

Sonda: Ácido nucleico aislado, oligonucleótido sintético aislado, unido a un molécula marcadora o indicadora detectable. Los marcadores típicos incluyen isótopos radioactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas. Se discuten métodos para el marcaje y orientación en la elección de marcadores apropiados para diversos fines, p. ej., en Sambrook et al. (En: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1989) y Ausubel et al. (En: Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. y Wiley-Intersciences, 1992).

Un experto habitual en la materia apreciará que la especificidad de una sonda particular aumenta con su longitud. Por tanto, pueden seleccionarse sondas para proporcionar una especificidad adecuada y pueden comprender al menos 17, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos deseada. En ejemplos particulares, las sondas pueden ser de al menos 100, 250, 500, 600 o 1000 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos deseada.

Punto cuántico: Partícula nanométrica que presenta propiedades electrónicas y ópticas dependientes del tamaño debido al confinamiento cuántico. Se han construido puntos cuánticos, por ejemplo, de materiales semiconductores (p.ej., selenuro de cadmio y sulfuro de plomo) y de cristalitos (cultivados por medio de epitaxia de haces moleculares), etc. Hay una variedad de puntos cuánticos que tienen diversas químicas superficiales y características

de fluorescencia disponibles comercialmente de Invitrogen Corporation, Eugene, OR (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.815.064. 6.682.596 y 6.649.138). También hay puntos cuánticos disponibles comercialmente de Evident Technologies (Troy, NY). Otros puntos cuánticos incluyen puntos cuánticos de aleaciones tales como puntos cuánticos de ZnSSe, ZnSeTe, ZnSTe, CdSSe, CdSeTe, ScSTe, HgSSe, HgSeTe, HgSTe, ZnCdS, ZnCdSe, ZnCdTe, ZnHgS, ZnHgSe, ZnHgTe, CdHgS, CdHgSe, CdHgTe, ZnCdSSe, ZnHgSSe, ZnCdSeTe, ZnHgSeTe, CdHgSSe, CdHgSeTe, InGaAs, GaAlAs, e InGaN (se desvelan puntos cuánticos de aleación y métodos para fabricar los mismos, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. n.º 2005/0012182 y la publicación PCT WO 2005/001889).

Muestra: el término “muestra” se refiere a cualquier sustancia (o material) líquida, semisólida o sólida dentro o sobre la cual puede estar presente una diana. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra obtenida a partir de un material biológico. Los ejemplos de muestras biológicas incluyen muestras de tejido y muestras citológicas. En algunos ejemplos, la muestra biológica se obtiene a partir de un sujeto animal, tal como un sujeto humano. Una muestra biológica es cualquier muestra sólida o muestra de fluido obtenida de, excretada por o segregada por cualquier organismo vivo, incluyendo sin limitación, organismos unicelulares, tales como bacterias, levaduras, protozoos, y amebas entre otros, organismos pluricelulares (tales como plantas o animales, incluyendo muestras de un sujeto humano sano o aparentemente sano o un paciente humano afectado por una afección o enfermedad para su diagnóstico o investigación, tal como el cáncer. Por ejemplo, una muestra biológica puede ser un líquido biológico obtenido de, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido ascítico, saliva, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o humor vítreo, o cualquier secreción corporal, un trasudado, un exudado (por ejemplo, líquido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o líquido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una muestra de biopsia o autopsia, tal como una biopsia tumoral) o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o una célula cultivada) o un medio acondicionado por cualquier célula, tejido u órgano. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un extracto nuclear. En algunos ejemplos, una muestra biológica es un citoplasma bacteriano. En otros ejemplos, una muestra es una muestra de ensayo. Por ejemplo, una muestra de ensayo es una célula, un tejido o sedimento celular preparado a partir de una muestra biológica obtenida de un sujeto. En un ejemplo, el sujeto es una que está en riesgo o ha adquirido una afección o enfermedad particular.

Colorante: Cualquier entidad biológica o química que, cuando se aplica a las moléculas diana en la muestra biológica, hace a las moléculas detectables al examen microscópico. Los colorantes incluyen, sin limitación, sondas de ácidos nucleicos, anticuerpos, colorantes y otros reactivos detectables que, en combinación o por sí mismos resultan en un producto final coloreado (mediante metodologías de detección por fluorescencia o campo claro). Un colorante de contraste es un colorante de un color que contrasta, o un colorante que se aplica hacer más discernibles los efectos de otro colorante.

Tejido: Colección de células interconectadas que realizan una función similar dentro de un organismo. Cualquier colección de células que puede montarse sobre un portaobjetos de cristal para microscopio convencional incluyendo, sin limitación, secciones de órganos, secciones de tumor, fluidos corporales, frotis, secciones congeladas, preparaciones citológicas, y líneas celulares.

II. Nanomateriales

Los nanomateriales, tales como puntos cuánticos, nanocristales y nanopartículas proporcionan ventajas exclusivas sobre sus homólogos fluoróforos de molécula pequeña debido a sus propiedades ópticas y electrónicas dependientes de sus características estructurales y químicas. Los nanomateriales tales como los nanocristales semiconductores poseen propiedades ópticas tales como absorción óptica de amplio espectro, un gran desplazamiento de Stokes, espectro de emisión estrechos y/o altos rendimientos cuánticos fotoestables. Esto permite que los nanomateriales sean excelentes indicadores ópticos. Debido a los estrechos espectros de emisión, los nanocristales pueden diferenciarse por sus distintivos ópticos y pueden usarse en ensayos fluorescentes de detección múltiple con escasa o nula convolución de la señal fotoluminiscente. El intervalo espectral de la señal puede oscilar desde el UV hasta dentro del IR cercano.

Los nanomateriales adecuados incluyen puntos cuánticos, nanopartículas metálicas, y nanopartículas de óxido metálico. Por ejemplo, las nanopartículas metálicas proporcionan una tinción óptica de contraste del ADN nuclear en microscopía de campo claro. Los metales adecuados incluyen, pero no se limitan a, oro, plata, paladio, platino, y aleaciones de metales de transición (p. ej., Au/Ag). Los nanomateriales a base de complejos de metales de transición, p. ej., las nanopartículas de tipo azul de Prusia, también son adecuados. Los complejos metálicos de tipo azul de Prusia comprenden una estructura cristalina tridimensional que incluye dos tipos de átomos metálicos en una red cristalina de tipo NaCl reticulada con grupos ciano (véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n.º 2010/0133487), los metales de ejemplo incluyen vanadio, cromo, molibdeno, tungsteno, manganeso, hierro, rutenio, cobalto, níquel, platino, y cobre. Las nanopartículas de óxido metálico, incluyendo alúmina, sílice y titanio pueden ser adecuadas. Las nanopartículas de óxido metálico dopadas con lantánidos fluorescentes también pueden usarse en la generación de imágenes fluorescentes, pero no son adecuadas para la generación de imágenes de campo claro. Todos estos materiales pueden modificarse para portar los restos de unión a ADN y emplearse para detectar y teñir

ADN nuclear.

Los puntos cuánticos son partículas nanocristalinas semiconductoras y sin limitar la presente invención para su uso con partículas emisoras de luz de un tamaño particular, miden típicamente 2-10 nm de tamaño. Los puntos cuánticos son fluoróforos estables, suelen ser resistentes al fotoblanqueo y tienen un amplio intervalo de longitud de onda de excitación y estrechos espectros de emisión. Pueden seleccionarse puntos cuánticos que tienen características de emisión particulares, tales como emisiones a longitudes de onda particulares, de modo que pueden usarse varios puntos cuánticos diferentes que tienen varias características de emisión diferentes para identificar varias dianas diferentes.

En algunas realizaciones, los puntos cuánticos están protegidos por una cubierta de óxido de trioctilfosfina (TOPO, por sus siglas en inglés) unida de forma electrostática y por un polímero anfífilo intercalante para inducir solubilidad en agua. Este polímero tiene aproximadamente 30 grupos amina terminales para su funcionalización adicional. Véase E.W. Williams, et al. "Surface-Modified Semiconductive and Metallic Nanoparticles Having Enhanced Dispersibility in Aqueous Media", Patente de EE.UU. n.º 6.649.138. Los grupos amina terminales pueden usarse para conjugar el punto cuántico con un resto de unión a ADN.

Los conjugados de puntos cuánticos se caracterizan por rendimientos cuánticos comparables a los colorantes tradicionales más brillantes disponibles. Además, estos fluoróforos a base de puntos cuánticos absorben 10-1000 más luz que los colorantes tradicionales. La emisión a partir de los puntos cuánticos es estrecha y simétrica, lo cual significa que el solapamiento con otros colores se reduce al mínimo, resultando en un flujo mínimo hacia canales de detección adyacentes y una interferencia atenuada, a pesar de que pueden usarse muchos más colores de forma simultánea. Los espectros de emisión simétricos y ajustables pueden variarse de acuerdo con el tamaño y la composición del material de las partículas, lo cual permite una distribución espacial flexible y cercana de diferentes puntos cuánticos sin un solapamiento espectral sustancial. Además, sus espectros de absorción son amplios, lo cual hace posible excitar de forma simultánea a todas las variantes de color de los puntos cuánticos usando una única longitud de onda de excitación, reduciendo así al mínimo la autofluorescencia de la muestra.

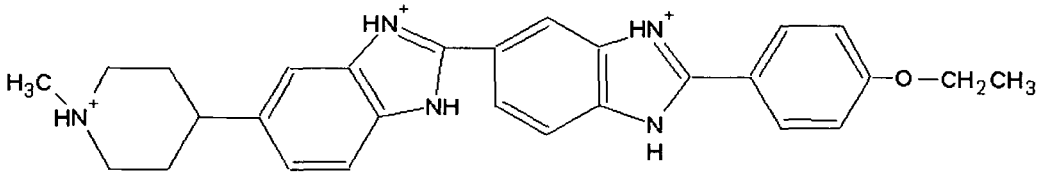
Los microscopios de fluorescencia convencionales son una herramienta económica para la detección de conjugados de puntos cuánticos. Dado que los conjugados de puntos cuánticos son prácticamente fotoestables, se puede dedicar tiempo con el microscopio a encontrar las regiones de interés y a concentrarse adecuadamente en las muestras.

III. Moléculas que interaccionan con el ADN

La capacidad para dirigir un nanomaterial al ADN nuclear se proporciona conjugando el nanomaterial (p. ej., un punto cuántico) con una molécula pequeña que es capaz de interaccionar con el ADN. Las moléculas pequeñas que se dirigen a los nanomateriales y los dirigen hacia el ADN pueden ser moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, o complejos de metales de transición. Estos agentes interaccionan con el ADN a través de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y/o enlaces covalentes. Pueden clasificarse adicionalmente en categorías basadas en su regioselectividad por el ADN, tales como agentes de unión a los surcos menor y mayor, agentes de unión a la cadena principal de fosfato, intercalantes y agentes modificadores de bases/alquilantes. Las moléculas pequeñas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, agentes de unión a los surcos del ADN tales como DAPI y colorante de Hoechst; intercalantes tales como psoraleno, naftalendiimida y SYBR101 (un colorante fluorescente, disponible de Invitrogen Corporation), y modificadores de las bases del ADN tales como psoraleno. Algunas moléculas que interaccionan con el ADN interaccionan a través de una combinación de mecanismos, es decir, unión al surco menor e intercalación, intercalación y alquilación y otras combinaciones. Las moléculas de ejemplo incluyen lexitropsinas, combilexinas, ácidos péptido nucleicos e inhibidores de la topoisomerasa I (p. ej., indenoisoquinolinas). (Véase, p. ej., Pindur et al., Current Medicinal Chemistry, 2005, 12:2805-2847.)

A. Agentes de unión al surco menor

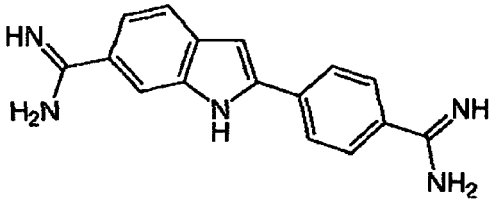
Las moléculas pequeñas que se unen al surco menor incluyen, pero no se limitan a, DAPI, los colorantes de Hoechst, distamicina A, netropsina, actinomicina D, lexitropsinas, combilexinas, poliamidas de *N*-metil pirrol y *N*-metil imidazol. Los colorantes de Hoechst son una familia de bis-bencimidas. La estructura de un colorante de Hoechst, Hoechst 33342, se muestra a continuación:



Hoechst 33342

Otro colorante de Hoechst común es el Hoechst 33258, que difiere del Hoechst 33342 porque tiene un hidrógeno en lugar del grupo etilo.

El DAPI, o 4',6-diamidino-2-fenilindol, es otro agente de unión al surco menor:



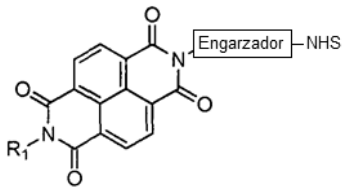
DAPI

DPI se asocia con los grupos de nucleótidos AT en el surco menor del ADN bicatenario y puede usarse como un colorante de contraste nuclear. El DAPI produce fluorescencia azul; sin embargo, al igual que otros colorantes fluorescentes, el DAPI sufre degradación fotoinducida de la intensidad de fotoluminiscencia a lo largo del tiempo.

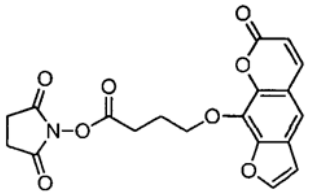
La alta afinidad del DAPI por el surco menor del ADN puede utilizarse para dirigir un punto cuántico hacia el ADN nuclear, produciendo ADN teñido con puntos cuánticos en células y tejido fijados. De manera destacable, el patrón y morfología de tinción de los núcleos es similar a la tinción de DAPI (fig. 3A-B). El examen espectroscópico de la tinción muestra tanto la señal óptica sucinta del punto cuántico como el amplio distintivo indicativo del colorante orgánico, DAPI. La ventaja de este conjugado es que proporciona una tinción y morfología nucleares muy similares al DAPI, a la vez que posee la señal fotoestable del punto cuántico.

B. Intercalantes de ADN

Los intercalantes son moléculas que interaccionan con el ADN insertándose entre las bases del ADN bicatenario; se mantienen en su posición mediante fuerzas de van der Waals. Los ejemplos de intercalantes de ADN incluyen, pero no se limitan a, actinomicina D, combilexinas, psoraleno y naftalendiimida (NDI):



Éster NHS de naftalendiimida



Éster NHS de psoraleno

La conjugación de puntos cuánticos con estas moléculas resulta en tinción nuclear. La intensidad de la tinción depende, al menos en parte, del intercalante particular y de las concentraciones del conjugado aplicado a la muestra de célula o tejido.

El punto cuántico de psoraleno demuestra una alta afinidad por el ADN nuclear en el tejido. La tinción muestra las características morfológicas del núcleo. A una concentración de 100 nM, el núcleo está claramente delimitado del tejido circundante (véase, p. ej., la fig. 4).

Se observa aún mayor especificidad y afinidad por el ADN nuclear cuando se conjuga un punto cuántico con naftalendiimida. Se observan delimitación y morfología distintas a concentraciones de 50 nM y mayores (véase, p. ej., la fig. 5). Las concentraciones cercanas a 25 nM tiñen adecuadamente el límite periférico del núcleo y muestran cierto grado de morfología nuclear. De hecho, concentraciones de sólo 6 nM son capaces de teñir el núcleo y diferenciarlo del tejido circundante. Por tanto, los conjugados de punto cuántico-naftalendiimida son útiles para la tinción de contraste nuclear en tejidos fijados a concentraciones mayores de 5 NM, mayores de 20 nM, o mayores de 50 nM, tales como concentraciones que oscilan de 5 nM a 100 nM, de 20 nM a 75 nM, o de 25 nM a 50 nM.

El estrecho espectro de emisión del punto cuántico permite el uso de la tinción nuclear en conjunto con otras sondas que utilizan puntos cuánticos que emiten fluorescencia a longitudes de onda diferentes. Por ejemplo, cuanto se usó una sonda de punto cuántico-naftalendiimida para teñir tejido prostático a concentraciones de 25 nM, también fueron visibles las sondas de punto cuántico de FISH los ensayos fluorescentes tanto de color doble de TMPRSS2 (3'5' ERG) (Fig. 6) como de color doble de HER2-Chr17 (FIG. 7). Este conjugado de punto cuántico también se usó en un ensayo de FISH con cuatro sondas cuánticas TMPRSS2 (3' 5' ERG), ERG, SLC45A3, y ETV1 (fig. 8). En cada uno de estos ensayos, los colorantes de ADN mostraron un rendimiento superior debido a su estabilidad espectral y a su solapamiento de espectros mínimo.

C. Agentes alquilantes del ADN

Otra ventaja proporcionada por el ligando de psoraleno es la capacidad para unir de forma covalente el punto cuántico a las bases del ADN. Con irradiación UV (es decir, >350 nm), el psoraleno sufre una cicloadición 2+2 fotoinducida a la base timidina. Este proceso une de forma covalente el conjugado de punto cuántico-psoraleno al ADN. Otros agentes de unión al ADN que son agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, análogos y derivados de lexitropsinas y poliamidas de pirrol-imidazol (tales como mostazas de nitrógeno) (Pindur *et al.*).

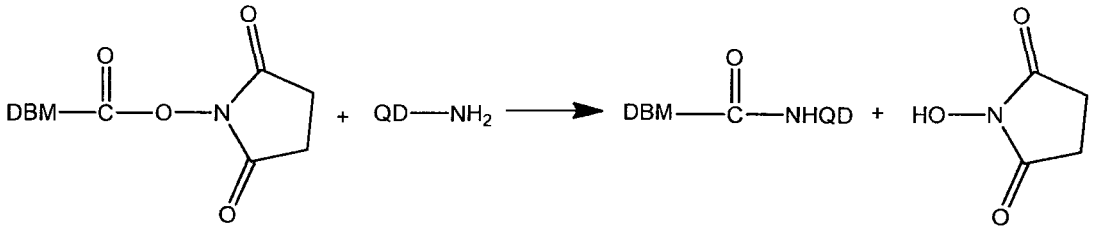
IV. Preparación de conjugados de nanomaterial/resto de unión a ADN

Los nanomateriales, p. ej., puntos cuánticos, y restos de unión a ADN que comprenden al menos una molécula de unión o dirigida hacia el ADN, se juntan con técnicas de condensación convencionales utilizando restos carboxilo activados y aminas sobre el nanomaterial y/o molécula dirigida hacia el ADN. Algunas moléculas de unión a ADN pueden usarse sin modificación para preparar conjugados de nanomaterial/resto de unión a ADN. Por ejemplo, succinimidil-[4-(psoralen-8-iloxi)] butirato, un derivado del psoraleno, está disponible comercialmente y puede usarse sin ninguna modificación adicional.

En algunas realizaciones, se modifica un resto de unión a ADN para facilitar la conjugación con un nanomaterial, tal como un punto cuántico o una nanopartícula metálica. Para facilitar más la conjugación, el nanomaterial también puede modificarse para incluir grupo(s) funcional(es) adecuados para la conjugación. Por ejemplo, los puntos cuánticos pueden incluir una capa pasivante funcionalizada externa que comprende grupos amino. Las nanopartículas metálicas pueden incluir, de forma similar, una capa funcionalizada externa que comprende grupos funcionales (p. ej., amino, ciano, tiol, carboxilo etc.) adecuada para su conjugación con una molécula de unión a ADN.

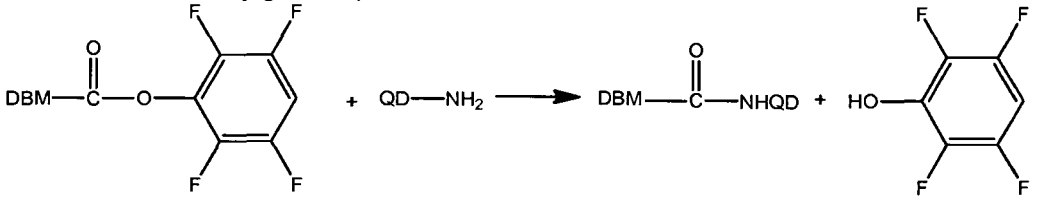
En una realización particular, la modificación de un resto de unión a ADN para incluir un grupo funcional éster de *N*-hidroxisuccinimida permite la conjugación de la molécula de unión a ADN con un punto cuántico por medio del resto de éster NHS y un grupo amino del punto cuántico. La fig. 9 ilustra un esquema sintético general para la adición de restos éster NHS a restos de unión a ADN, p. ej., naftalendiimida Los R_1 y R_2 son independientemente una cadena alifática sustituida o sin sustituir, aromática sustituida o sin sustituir, heteroaromática, o de polialquilheteroátomo tal como una cadena de óxido de alquileno (p. ej., un polialquilenglicol).

El resto éster NHS puede reaccionar con un grupo amina primaria sobre la superficie de un punto cuántico, formando un conjugado de punto cuántico-resto de unión a ADN, tal como se muestra a continuación, donde "DBM" representa un resto de unión a ADN y "QD" representa un "punto cuántico" (siglas en inglés).

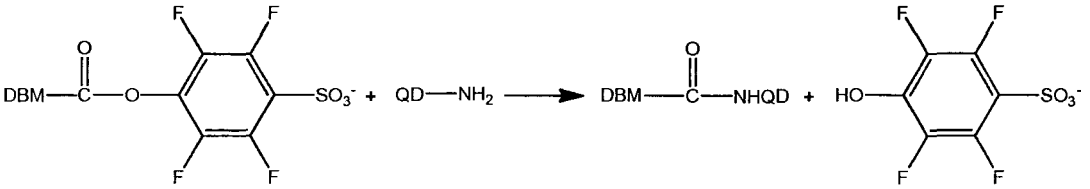


Tal como se muestra en la fig. 10, un éster succinimidilo de psoraleno puede reaccionar con un grupo amina primaria sobre la superficie de un punto cuántico para proporcionar un conjugado de punto cuántico-psoraleno.

En otra realización, puede modificarse un resto de unión a ADN para incluir un resto éster de tetrafluorofenilo (TFP, por sus siglas en inglés). El resto éster TFP puede reaccionar con un grupo amina primaria sobre la superficie del punto cuántico, formando un conjugado de punto cuántico-resto de unión al ADN.



En otra realización, puede modificarse un resto de unión a ADN para incluir un resto éster de 4-sulfo-2,3,5,6-fluorofenilo (STP). El resto éster STP puede reaccionar con un grupo amina primaria sobre la superficie del punto cuántico, formando un conjugado de punto cuántico-resto de unión al ADN.



En otra realización más, puede modificarse un resto de unión a ADN para incluir un resto de cloruro de sulfonilo. El de cloruro de sulfonilo puede reaccionar con un grupo amina primaria sobre la superficie del punto cuántico, formando un conjugado de punto cuántico-resto de unión al ADN.

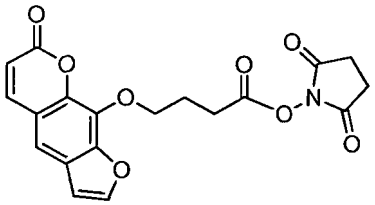
$$DBMSO_2Cl + QDNH_2 \rightarrow DBMSO_2\text{-}NHQD + HCl$$

También pueden emplearse otras transformaciones químicas que son adecuadas en un entorno acuoso, p. ej., con NDI-C6 (naftalendiimida con un engarzador C6). Otros métodos de acoplamiento adecuados se describen, p. ej., por Hermanson (Bioconjugate Techniques, segunda edición, 2 de mayo de 2008). La purificación de conjugados a partir de moléculas que interaccionan con el ADN libres puede hacerse con cromatografía de exclusión por tamaño.

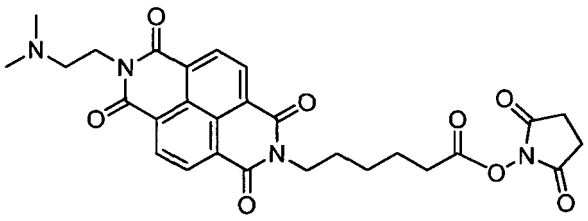
En algunas realizaciones, el conjugado de punto cuántico-resto de unión a ADN incluye un engarzador entre el punto cuántico y la molécula de unión a ADN. El engarzador proporciona distancia entre el punto cuántico y la molécula de unión a ADN y puede reducir restricciones estructurales, facilitando así la unión del conjugado al ADN. Puede usarse cualquier engarzador conocido actualmente para este propósito, o desarrollado en el futuro, para formar realizaciones de los conjugados que se desvelan. Los engarzadores útiles pueden ser tanto homo como heterobifuncionales.

Una primera clase de engarzadores adecuados incluye compuestos alifáticos, tales como cadenas de hidrocarburo alifático que tienen uno o más sitios de insaturación, o cadenas alquilo. La cadena alifática también incluye típicamente grupos funcionales terminales que facilitan el acoplamiento a una molécula de unión a ADN. La longitud de la cadena puede variar, pero típicamente tiene una longitud de 1-30 átomos de carbono. Sin embargo, Un experto en la técnica apreciará que, si un engarzador particular tiene más de 30 átomos y aún opera de forma eficaz para ligar una nanopartícula a una molécula de unión a ADN y el conjugado aún funciona de la forma deseada, entonces, dichos ligamientos de cadena están dentro del alcance de la presente divulgación.

Una segunda clase de engarzadores útiles para practicar realizaciones de la presente divulgación incluye óxidos de alquileno. Los óxidos de alquileno se representan en el presente documento mediante referencia a glicoles, tales como etilenglicoles. En algunas realizaciones, es útil que la hidrofilicidad del engarzador aumente en relación con la longitud de cadena de su cadena de hidrocarburo. Un experto en la técnica apreciará que, a medida que aumenta el número de átomos de oxígeno, también puede aumentar la hidrofilicidad del compuesto. Por tanto, los engarzadores de la presente invención pueden tener una fórmula de $(-OCH_2CH_2-)_n$ en la que n es de alrededor de 2 a alrededor de 15, pero más particularmente es de alrededor de 2 a alrededor de 8. En la publicación de EE.UU. n.º 2006/0246524 y en la publicación de EE.UU. n.º 2007/0117153, se describen engarzadores heterobifuncionales que pueden ser útiles para llevar a la práctica ciertas realizaciones desveladas de la presente invención. Se han sintetizado y conjugado con puntos cuánticos engarzadores que contienen psoraleno y naftalendiimida (NDI) (mostrados a continuación).

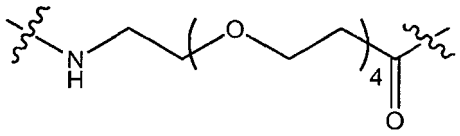


Engarzador de psoraleno

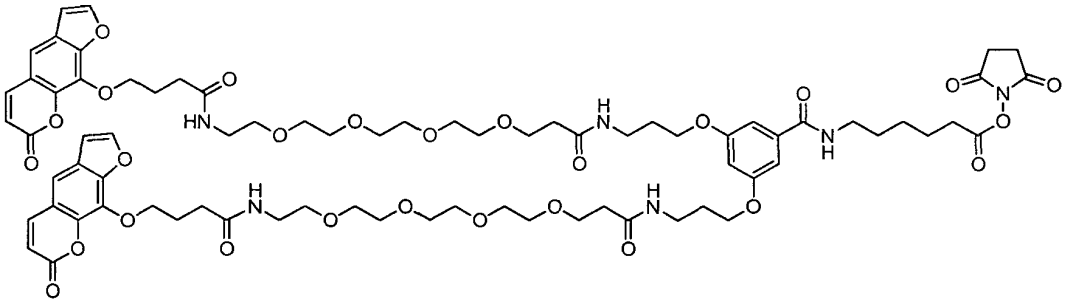


Engarzador de NDI

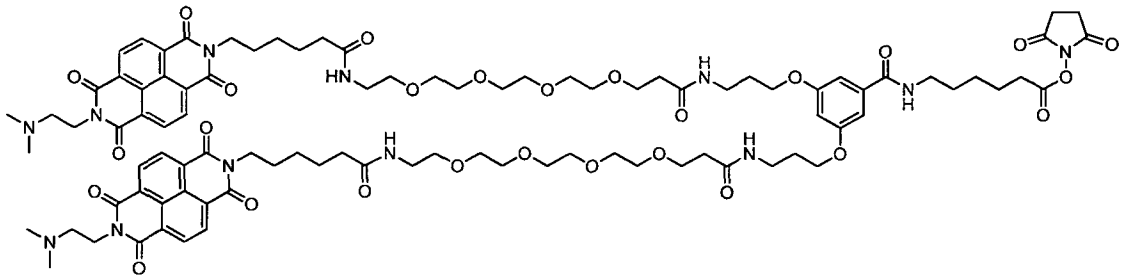
En algunas realizaciones, la sensibilidad y selectividad del colorante de punto cuántico aumenta mediante el uso de engarzadores de ramificación multifuncional a los cuales se unen de forma covalente una pluralidad de moléculas de unión a ADN. En algunas realizaciones, los engarzadores son engarzadores *bis* a los cuales se ligan dos moléculas de unión a ADN. En ciertas realizaciones, el engarzador bis incluye dos cadenas de polietilenglicol ligadas a un resto común tal como un éster de *N*-hidroxisuccinimida. Las cadenas de polietilenglicol tienen una fórmula PEG_n en la que n es 1-50, tal como 4 u 8. En una realización particular, el engarzador tiene la siguiente estructura química.



En algunas realizaciones, un punto cuántico puede conjugarse con el engarzador multifuncional por medio de una reacción de condensación con el resto de *N*-hidroxisuccinimida del engarzador. Los engarzadores ramificados aumentan la concentración local de moléculas de unión a ADN, aumentando así la afinidad por el ADN nuclear. Los ejemplos de engarzadores bis que contienen psoraleno y naftalendiimida (NDI) tienen las siguientes estructuras.



Bis-psoraleno



Bis-NDI-C6

La conjugación de un nanocristal con un máximo de emisión en la región de menor longitud de onda del espectro visible con una molécula de unión al ADN proporciona un sustitutivo a base de nanomateriales fotoestable para colorantes de contraste del ADN comunes tales como los colorantes de ácidos nucleicos DAPI y de Hoechst. Los conjugados finales pueden usarse para dirigir y unir el nanomaterial a un ADN bicatenario. Cuando se usa un nanocristal semiconductor como nanomaterial, la fotoluminiscencia del punto cuántico y, posiblemente, de la molécula de unión al ADN señalarán la unión del conjugado al ADN. Si este conjugado se aplica al ADN que se encuentra en el núcleo de una célula, el conjugado se unirá de forma selectiva a la cromatina del núcleo, proporcionando visualización del ADN dentro del núcleo. Esto proporciona una detección, delimitación y morfología fluorescentes del núcleo.

Los puntos cuánticos disponibles comercialmente con máximos de emisión alrededor de 490 nm sirven como un nanomaterial apropiado que se corresponde estrechamente con los máximos espectrales de los colorantes de ADN comunes. Estos nanocristales conjugados con las moléculas que interaccionan con el ADN, tales como derivados de naftalendiimida y psoraleno, proporcionan una tinción nuclear del ADN en el tejido que se corresponde y sobrepasa el rendimiento de los colorantes de contraste DAPI y de Hoechst. Las ventajas del sistema de nanocristales semiconductores se basan en las propiedades fotofísicas del nanomaterial. Por ejemplo, el espectro de fotoluminiscencia de un punto cuántico de 490 nm es estrecho y no solapa de forma significativa con el espectro de los puntos cuánticos de 565 o de cualquier punto cuántico de frecuencia inferior (fig. 11), superando así el solapamiento de fluorescencia espectral intrínseco de los colorantes orgánicos de ADN. Por el contrario, pueden emplearse puntos cuánticos emisores de mayor longitud de onda en conjunto con restos de unión a ADN para delimitar el núcleo en tejido fijado. Por tanto, pueden utilizarse puntos cuánticos con propiedades fotoluminiscentes fuera de los espectros de emisión de los colorantes de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) sin convolución de las señales de FISH.

Otra ventaja es la estabilidad de la señal fotoluminiscente. Se sabe que los fluoróforos comunes sucumben al fotoblanqueo, lo cual resulta en intensidad reducida y cambios en los distintivos espectrales de una materia de segundos a minutos. Sin embargo, en algunas realizaciones, los conjugados de punto cuántico-molécula de unión a ADN no muestran cambios en la intensidad o frecuencia de la emisión en excitación continua para un exceso de 30 minutos. Esta ventaja se alcanza totalmente en conjunto con ensayos que usan puntos cuánticos complementarios espectralmente tales como el ensayo de punto cuántico de TMPRSS2 de próstata (fig. 12). Esta tecnología tiene aplicación para una variedad de ensayos fotoluminiscentes de campo oscuro, incluyendo la detección del a base de puntos cuánticos del gen HER2 en tejido mamario (fig. 13). La estabilidad de la señal del conjugado permite la preparación de portaobjetos para archivo de muestras de tejido fijado con núcleos visualizados, superando así la desventaja intrínseca del DAPI.

La tinción nuclear a base de puntos cuánticos también sirve como un marcador de núcleos fluorescente que puede usarse en conjunto con las técnicas de generación de imágenes de pseudo hematoxilina y eosina. Aquí el QD490, o cualquier otro nanocristal semiconductor, proporcionan la tinción equivalente a la hematoxilina. Esto proporciona el campo pseudo claro de las imágenes de campo oscuro de los ensayos de FISH fluorescentes (fig. 14-15).

V. Preparación de la muestra

Las muestras de tejido que se describen en el presente documento pueden prepararse usando cualquier método conocido actualmente o desarrollado de aquí en adelante en la técnica. En general, las muestras de tejido se preparan fijando e incluyendo el tejido en un medio.

En algunos ejemplos, se usa un medio de inclusión. Un medio de inclusión es un material inerte en el cual se incluyen tejidos y/o células para conservarlos para futuros análisis. La inclusión también permite cortar las muestras de tejido en secciones finas. Los medios de inclusión incluyen, pero no se limitan a, parafina, celoidina, compuesto OCT™, agar, plásticos, o acrílicos.

Numerosos medios de inclusión son hidrófobos; por tanto, puede ser necesario eliminar el material inerte antes del análisis histológico o citológico, el cual utiliza fundamentalmente reactivos hidrófilos. El término desparafinación o desparafinado se usa ampliamente en el presente documento para referirse a la eliminación parcial o total de cualquier tipo de medio de inclusión de una muestra biológica. En algunas realizaciones, las secciones incluidas en parafina se desparafinan usando detergentes acuosos y calor.

El proceso de fijación de una muestra puede variar. La fijación de una muestra de tejido conserva los constituyentes celulares y tisulares en un estado lo más parecido posible al vivo y permite someterlos a procedimientos preparatorios sin cambios significativos. La fijación detiene los procesos de autolisis y descomposición bacteriana que comienzan tras la muerte celular y estabiliza los constituyentes celulares y tisulares para que resistan las etapas posteriores del procesamiento tisular, tales como para la IHQ o la HIS.

Los tejidos pueden fijarse mediante cualquier proceso adecuado, incluyendo la perfusión o mediante la inmersión en un fijador. Los fijadores pueden clasificarse en agentes reticulantes (tales como aldehídos, p. ej., formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes reticulantes no aldehídos), agentes oxidantes (p. ej., complejos e iones metálicos, tales como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturalizantes de proteínas (p. ej., ácido acético, metanol, y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (p. ej., cloruro mercúrico, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (p. ej., fijador de Carnoy, metacarn, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y fijadores diversos (p. ej., fijación por volumen excluido y fijación por vapor). También pueden incluirse aditivos en el fijador, tales como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (tales como cloruro de cinc, sulfato de cinc y sales de litio) y lantano.

El fijador usado más frecuentemente para preparar muestras para IHQ es el formaldehído, generalmente en forma de una solución de formalina (formaldehído al 4 % en una solución tampón, denominado como formalina tamponada al 10 %). En un ejemplo, el fijador es formalina tamponada neutra al 10 %.

En múltiples casos, se ha demostrado que el tejido sobrefijado (fijado durante duraciones mayores de 48 horas) proporciona una mayor cantidad de autofluorescencia de fondo que el tejido fijado durante ~24 horas. La intensidad de señal del colorante nuclear de punto cuántico cae significativamente (aproximadamente 30-50 %) en muestras que exceden las 48 horas de tiempo de fijación, en comparación con los tejidos fijados entre 24-48 horas.

Debido al tamaño de un conjugado de punto cuántico, los núcleos en las células y tejidos fijados no son accesibles normalmente. Para permitir que el punto cuántico entre en el núcleo y tiña el ADN, hay que pretratar el tejido con una proteasa. La duración y concentración del tratamiento de proteasa, en conjunto con la concentración del conjugado de punto cuántico, determina el grado de la tinción del núcleo. En la mayoría de los tejidos, un tratamiento de 4-8 minutos con la proteasa (p. ej., proteasa III) es suficiente para permitir la delimitación del núcleo con el colorante de tinción de punto cuántico en el tejido fijado.

Además de la amígdala, con el conjugado QD490:NDI-C6 se han teñido xenotrasplantes de mama y tejido prostático, tejidos de cuello de útero y de pulmón. Ambos tejidos muestran una excelente tinción con una cantidad mínima de fondo (fig. 16-17).

VI. Determinaciones de la textura

La distribución de los cromosomas o el ADN en los núcleos de las células puede determinarse de forma cualitativa y/o cuantitativa usando un ordenador y técnicas de análisis de imagen. (Véase, p. ej., Rodenacker, et al., Analytical Cellular Pathology (2003) 25:1-36.) Estas determinaciones, o aspectos, pueden usarse para detectar signos precoces de comportamiento celular anómalo y/o diagnosticar cáncer, así como predecir resultados y pronósticos de pacientes.

Los aspectos que parecen tener el mayor poder discriminatorio son los aspectos de la textura. Dichos aspectos describen de forma cuantitativa la variación de la intensidad del patrón de la cromatina en el núcleo celular. Los aspectos de la textura de la cromatina usados más ampliamente se basan en una evaluación estadística o probabilística de los niveles de gris en la imagen microscópica reproducida.

Recientemente se ha introducido una nueva clase de aspectos de textura basada en una segmentación estructural de los agregados de cromatina (véase, p. ej., la patente de EE.UU: n.º 7.574.304). En esta estrategia, se hace un análisis informático de las partículas claras y oscuras de los aspectos de una imagen nuclear. En la bibliografía pueden encontrarse numerosos aspectos para caracterizar el tamaño, forma, límites y textura de los objetos de la imagen. Aunque estos aspectos se desarrollaron para el fin de caracterizar los núcleos celulares, pueden aplicarse de forma más general a cualquier objeto de imagen, incluyendo partículas nucleares segmentadas.

Algunos aspectos que pueden aplicarse en las realizaciones de la presente divulgación incluyen aspectos morfométricos (p. ej., área, perímetro, factor G), aspectos densitométricos (p. ej., volumen, valor de gris medio, dinámica de mínimos regional), aspectos de la textura (p. ej., área superficial) y aspectos contextuales (tales como distancia al límite nuclear). Con al último caso, los aspectos contextuales se analizan informáticamente a partir de (i) un grafo de vecindad definido sobre las partículas oscuras; (ii) un grafo de vecindad definido sobre las partículas claras; y/o (iii) un grafo de vecindad definido tanto sobre las partículas claras como las partículas oscuras. El tipo preferido de grafo de vecindad es el grafo de Delaunay. Para un grafo dado, puede definirse una matriz de coaparición para cada aspecto de una partícula y vecinas relacionadas en un espacio bidimensional digitalizado. Por ejemplo, a partir del histograma de áreas de partículas oscuras y del grafo de vecindad definido sobre estas partículas, es posible construir una matriz tal que la entrada en la fila i y en la columna j representa el número de veces que una partícula de área i está adyacente a una partícula de área j. Para mantener el tamaño de matriz manejable y/o evitar tener una matriz dispersa, puede reducirse el número de intervalos del histograma del aspecto en consideración. Para cada matriz de coaparición, los aspectos de la matriz de coaparición pueden analizarse informáticamente y usarse como aspectos del núcleo. Una vez que se han analizado informáticamente dichos aspectos, se usan algoritmos convencionales de reconocimiento de patrones para la selección de aspectos y el entrenamiento del clasificador. Pueden aplicarse al problema algoritmos tales como análisis discriminado, redes neuronales artificiales y/o máquinas de vectores de soporte al problema en una rutina de ensayo/entrenamiento/validación bien conocida para los expertos en la técnica. El resultado de dicho diseño clasificador es generalmente una curva de la característica operativa del receptor (COR) que resume la sensibilidad y especificidad de las compensaciones disponibles para el sistema. Una ventaja de la presente divulgación sobre la técnica previa es que las determinaciones de los aspectos que son de entrada a dichos sistemas de reconocimiento de patrones son de mucha más alta calidad de lo que era posible con colorantes de contraste nucleares menos específicos. Esto se traduce en determinaciones más precisas, mejor sensibilidad y especificidad de las COR y, por tanto, ensayos diagnósticos, predictivos y/o pronósticos más potentes.

VII. *Kits*

Las realizaciones de un *kit* para realizar la visualización del núcleo incluyen un conjugado de nanomaterial/ resto de unión a ADN y un tampón de reacción que tiene una concentración de sal y un pH suficientes para posibilitar que el conjugado entre en un núcleo dentro de un tejido pretratado con una composición enzimática de proteasa. En

algunas realizaciones, el nanomaterial es una nanopartícula, tal como una nanopartícula metálica o un punto cuántico. La molécula de unión a ADN puede ser un agente de unión al surco menor, un agente de unión al surco mayor, un intercalante, un agente alquilante de ADN, o una combinación de los mismos.

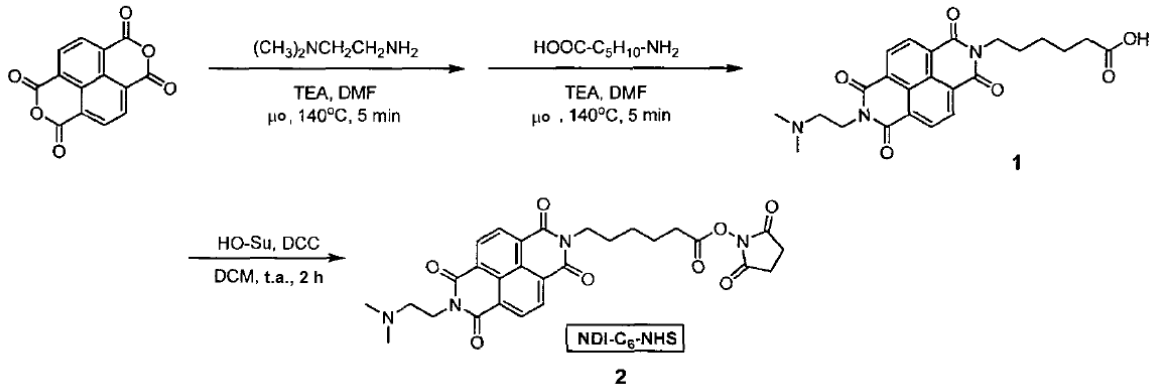
En algunas realizaciones, los *kits* incluyen además una enzima proteasa y un tampón de proteasa que tiene una concentración de sal y un pH suficientes para permitir que la enzima proteasa presente actividad proteolítica. La enzima proteasa y el tampón de proteasa pueden combinarse y proporcionarse como una composición de proteasa. Los *kits* también incluyen típicamente una hoja de instrucciones para realizar el método de visualización del núcleo.

VIII. Ejemplos

Ejemplo1

Síntesis de NDI-C6-NHS

Esquema 1:



Compuesto (1)

En un recipiente de reacción de 10 ml de microondas CEM con una barra de agitación se disolvieron 50 mg (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma N818) de dianhidrido 1,4,5,8-naftalentetracarboxílico, 20,3 ml (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma 39030) de *N,N*-dimetiletilendiamina y 25 ml (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma T0886) de trietilamina en 3 ml de DMF anhidra (EMD Biosciences). La mezcla se calentó a 140 ºC, con enfriamiento durante la irradiación para mantener una temperatura de 140 ºC, en un microondas CEM Discover durante 5 minutos. Se añadieron a la reacción 24 mg (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma A2504) de ácido 6-aminocaproico y 50 ml (0,372 mmol, 2 equivalentes, Sigma T0886) de trietilamina y se calentaron a 140 °C, con enfriamiento durante 5 minutos más. La reacción en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa (CH_3CN:TFA 0,05 % 10:90 en gradiente de H_2O hasta 90:10 a lo largo de 60 minutos, supervisando a 360 nm). Se aisló un polvo de color pardo en rendimiento del 63 %. Tiempo de retención analítico del HPLC 5,06 min. RMN ^{1}H (400 MHz, d_6-DMSO) δ 9,54 (s, 1 H), 8,69 (s, 4 H), 4,43 (t, *J*= 5,6 Hz, 2 H), 4,06 (t, *J*= 7,4 Hz, 2 H), 3,49 (t, *J*= 5,5 Hz, 3 H), 2,92 (s, 6 H), 2,24 (t, *J*= 7,3 Hz, 2 H), 1,75-1,63 (m, 2 H), 1,63-1,51 (m, 2 H), 1,39 (dd, *J*= 15,0, 8,0 Hz, 2 H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO) δ 174,89, 163,65, 163,06, 130,98, 130,90, 126,95, 126,74, 126,66, 126,58, 55,14, 43,21, 35,90, 33,94, 27,61, 26,48, 24,67. MS (TOF ESI+) m/z 452.1 (M+H).

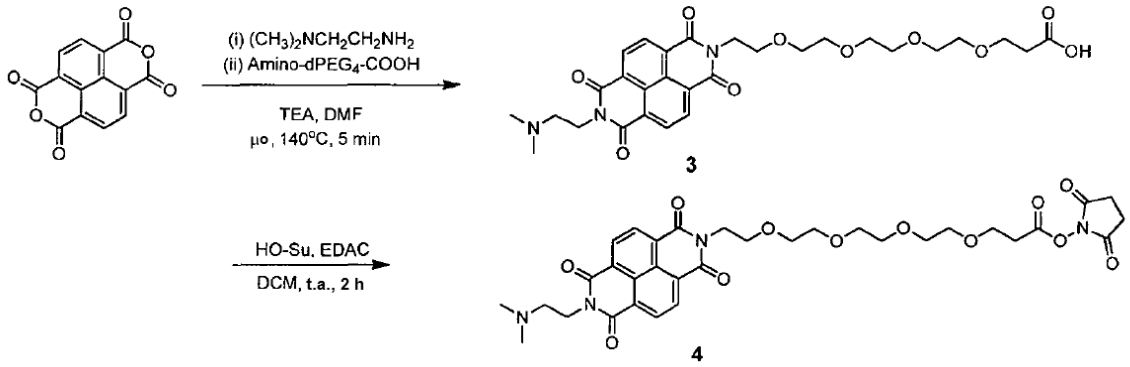
Compuesto (2)

Se disolvieron 44 mg (0,097 mmol, 1 equivalente) de (1), 12,3 mg (0,107 mmol, 1,1 equivalentes, Sigma 130672) de *N*-hidroxisuccinimida, 68 ml (0,485 mmol, 5 equivalentes, Sigma T0866) de trietilamina y 107 ml (solución 1,0 M en diclorometano, 0,107 mmol, 1,1 equivalentes, Sigma 379115) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida en 2 ml de diclorometano (Sigma). La reacción se agitó durante 2 horas, se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 25 ml de acetato de etilo, se lavó con dos porciones de agua desionizada, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró hasta dar un aceite de color pardo, con un rendimiento del 90% Tiempo de retención analítico del HPLC 6,65 min. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,77 (s, 4 H), 4,38 (t, *J*= 6,7 Hz, 2 H), 4,29-4,16 (m, 2 H), 2,83 (s, 4 H), 2,74 (t, *J*= 6,5 Hz, 2 H), 2,66 (t, *J*= 7,4 Hz, 2 H), 2,39 (s, 6 H), 1,84 (tt, *J*= 15,4, 7,7 Hz, 4 H), 1,57 (dd, *J*= 15,0, 7,2 Hz, 2 H). RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ 169,14, 168,46, 162,99, 162,84, 131,02, 130,98, 126,78, 126,71, 126,62, 56,86, 45,68, 40,49, 38,47, 30,78, 27,52, 26,14, 25,58, 24,23. MS (TOF ESI+) 549,1 (M+H).

Ejemplo 2

Síntesis de NDI-PEG$_4$-NHS

Esquema 2:



Compuesto (3)

En un recipiente de reacción de 10 ml de microondas CEM con una barra de agitación se disolvieron 50 mg (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma N818) de dianhidrido 1,4,5,8-naftalentetracarboxílico, 20,3 ml (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma 39030) de *N,N*-dimetiletilendiamina y 25 ml (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma T0886) de trietilamina en 3 ml de *N,N*-dimetilformamida anhidra (EMD Biosciences). La mezcla se calentó a 140 ºC en un microondas CEM Discover, con enfriamiento durante 5 minutos. Se añadieron a la reacción 49,4 mg (0,186 mmol, 1 equivalente, QuantaBioDesign 10244) de Amino-dPEG$_4$-COOH y 50 ml (0,372 mmol, 2 equivalentes, Sigma T0886) de trietilamina y se calentaron a 140 °C, con enfriamiento durante 5 minutos más. La reacción en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa (CH_3CN:TFA 0,05 % 10:90 en gradiente de H_2O hasta 90:10 a lo largo de 60 minutos, supervisando a 360 nm). Se aisló un aceite de color pardo en rendimiento del 63 %. Tiempo de retención analítico del HPLC 5,69 min. MS (TOF ESI+) m/z 586,2 (M+H).

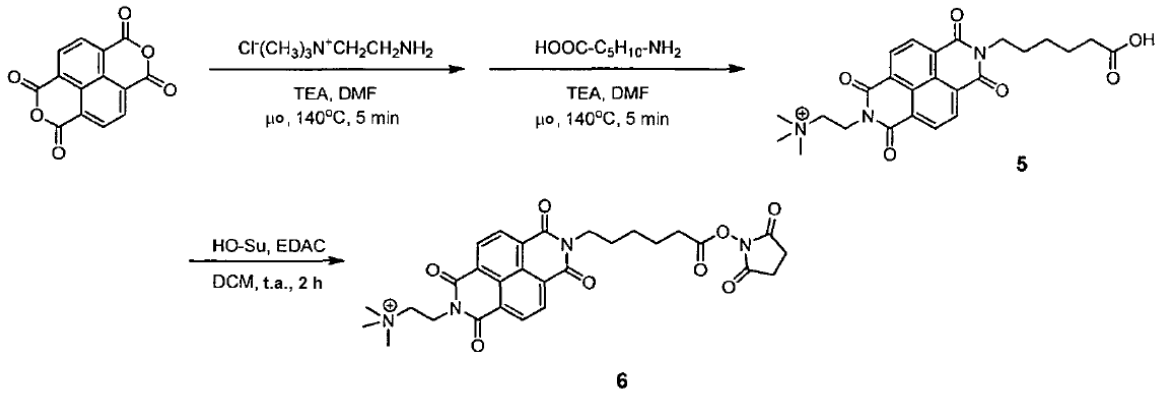
Compuesto (4)

Se disolvieron 69 mg (0,118 mmol, 1 equivalente) de (3), 14,2 mg (0,124 mmol, 1,05 equivalentes, Sigma 130672) de *N*-hidroxisuccinimida y 24,8 mg (0,130 mmol, 1,1 equivalentes, Sigma 379115) de clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida en 2 ml de diclorometano (Sigma). La reacción se agitó durante toda la noche y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 25 ml de acetato de etilo, se lavó con dos porciones de agua desionizada y se concentró. Se aisló un aceite de color pardo en rendimiento cuantitativo. Tiempo de retención analítico del HPLC 6,03 min. MS (TOF ESI+) 683,1 (M+H).

Ejemplo 3

Síntesis de $(NMe_3)^+$-NDI-C6-NHS

Esquema 3:



Compuesto (5)

En un recipiente de reacción de 10 ml de microondas CEM con una barra de agitación se disolvieron 50 mg (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma N818) de dianhidrido 1,4,5,8-naftalentetracarboxílico, 32,6 mg (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma 284556) de clorhidrato de (2-aminoetil)trimetilamonio y 78 ml (0,558 mmol, 3 equivalentes, Sigma T0886) en 3 ml de DMF anhidra (EMD Biosciences). La mezcla se calentó a 140 ºC en un microondas CEM Discover, con enfriamiento durante 5 minutos. Se añadieron a la reacción 24 mg (0,186 mmol, 1 equivalente, Sigma A2504) de ácido 6-aminocaproico y 78 ml (0,558 mmol, 3 equivalentes, Sigma T0886) de trietilamina y se calentaron a 140 °C, con enfriamiento durante 5 minutos más. La reacción en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa (CH_3CN:TFA 0,05 % 10:90 en gradiente de H_2O hasta 90:10 a lo largo de 60 minutos, supervisando a 360 nm). Se aisló un polvo de color verdoso/pardo en rendimiento del 91 %. Tiempo de retención del HPLC 6,09 min.

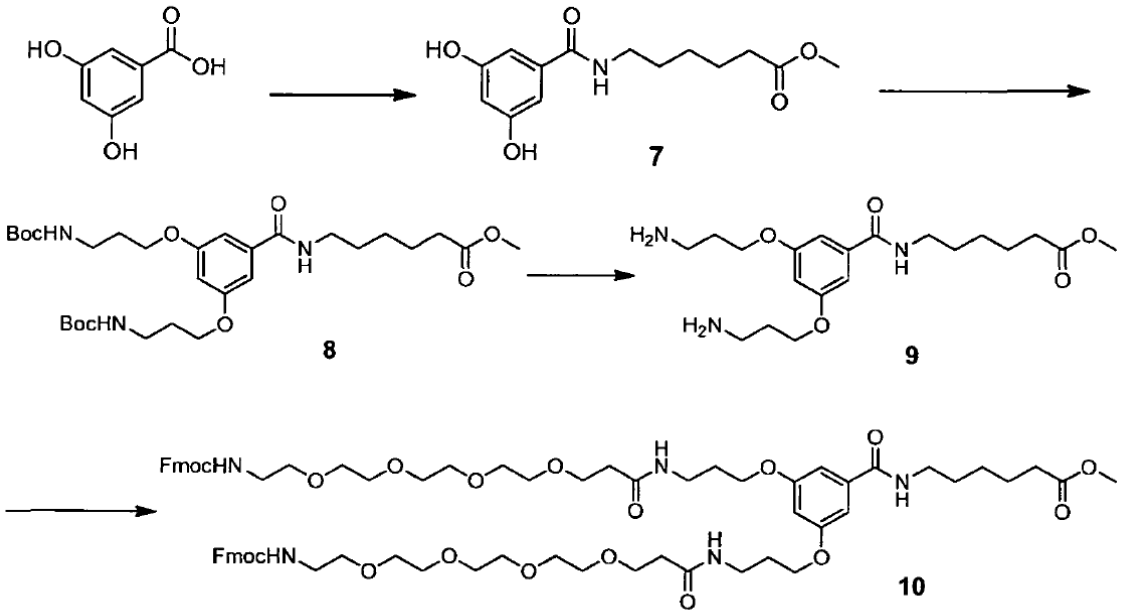
Compuesto (6)

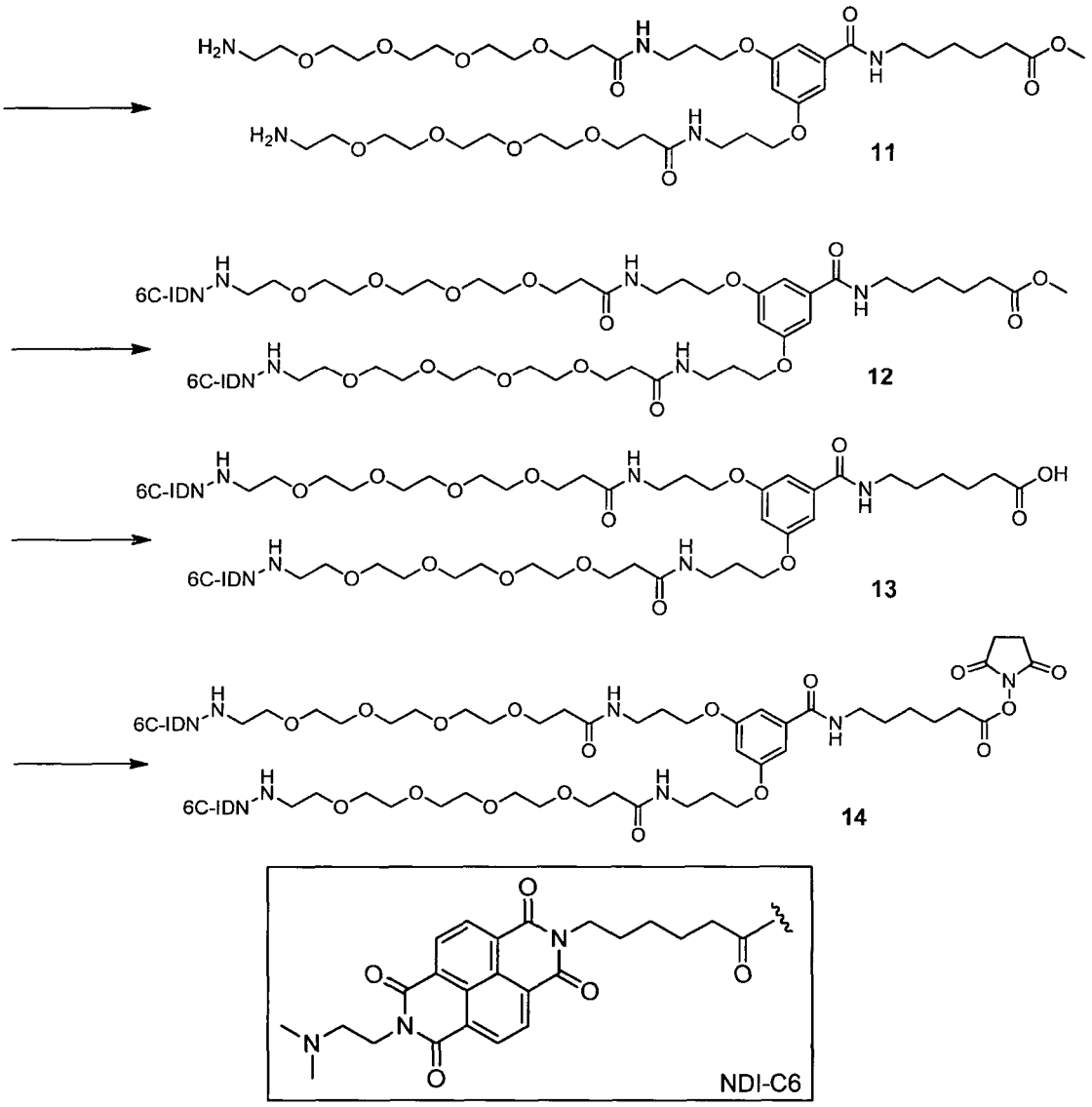
Se disolvieron 79 mg (0,169 mmol, 5 equivalentes) de (5), 23,4 mg (0,203 mmol, 1,2 equivalentes, Sigma 130672) de *N*-hidroxisuccinimida, 70,8 ml (0,508 mmol, 3 equivalentes, Sigma T0866) de trietilamina y 38,9 mg (0,203 mmol, 1,2 equivalentes, Sigma 379115) de clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida en 2 ml de diclorometano (Sigma). La reacción se agitó durante toda la noche y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 25 ml de acetato de etilo, se lavó con agua (2 x 25 ml), La fase acuosa se extrajo con 25 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron. Se aisló un aceite de color pardo en rendimiento cuantitativo. Tiempo de retención analítico del HPLC 6,94 min.

Ejemplo 4

Síntesis de engarzador Bis que contiene NDI-C6

Esquema 4:





Compuesto (7)

Se diluyeron 3 g (19,5 mmol, 1 equivalente, TCI D2554) de ácido 3,5-dihidroxibenzoico, 3,89 g (21,4 mmol, 1,1 equivalentes, Fluka 07270) de metil aminohexanoato, 8,14 ml (58,4 mmol, 3,0 equivalentes, Sigma T0886) de trietilamina y 29,2 ml (solución 1,0 M, 29,2 mmol, 1,5 equivalentes, Sigma 379115) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida con 100 ml of diclorometano y se agitaron durante toda la noche. La reacción en bruto se filtró y se concentró al vacío. El residuo se diluyó en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con HCl 1 M (200 ml), $NaHCO_3$ saturado (30 ml) y salmuera (15 ml). La solución se concentró al vacío, se hizo pasar a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en una columna de gel de sílice de 330 g Redisep® (Teledyne Isco, Inc., Lincoln, NE) (gradiente de acetato de etilo:hexanos 5:95 hasta 100:0). Rendimiento del 23 % de un polvo de color blanco Tiempo de retención analítico del HPLC 4,08 min. RMN ^{1}H (400 MHz, MeOD) δ 6,71 (d, *J*= 2,2 Hz, 2 H), 6,42 (t, *J*= 2,2 Hz, 1 H), 4,92 (s, 3 H), 3,66 (s, 3 H), 3,41-3,29 (m, 3 H), 2,35 (t, *J*= 7,4 Hz, 2 H), 1,64 (ddt, *J*= 18,4, 14,9, 7,4 Hz, 4 H), 1,47-1,33 (m, 2 H). RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) δ 174,53 (s, 169,19, 158,43, 136,67, 105,29, 105,05, 50,61, 39,31, 33,28, 28,71, 26,09, 24,29. MS (TOF ESI+) 282,4 (M+H).

Compuesto (8)

Se diluyeron 695 mg (2,47 mmol, 1 equivalente) de (7), 1,765 g (7,41 mmol, 3 equivalentes) de *terc*-butil 3-bromopropilcarbamato y 1,366 g (9,88 mmol, 4 equivalentes, Sigma 310263) de carbonato potásico con 12 ml de *N,N*-dimetilformamida y se calentaron a 50 °C durante toda la noche. El disolvente se eliminó al vacío, el residuo se disolvió con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró hasta dar un sólido de color blanco. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna de 50g Biotage® SNAP column (Biotage, LLC, Charlotte, NC) (gradiente de acetato de etilo:hexanos 12:88 hasta 100:0). Rendimiento del 73 % de un sólido de color blanco Tiempo de retención analítico de HPLC 10,34 min.

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,89 (d, *J*= 2,2 Hz, 2 H), 6,53 (t, *J*= 2,2 Hz, 1 H), 6,49 (t, *J*= 5,7 Hz, 1 H), 4,84 (s, 2 H), 4,01 (t, *J*= 5,9 Hz, 4 H), 3,66 (s, 3 H), 3,44 (dd, *J*= 13,1, 6,9 Hz, 2 H), 3,31 (dd, *J*= 12,3, 6,1 Hz, 4 H), 2,33 (t, *J*= 7,4 Hz, 2 H), 1,96 (p, *J*= 6,1 Hz, 4 H), 1,65 (tt, *J*= 15,2, 7,5 Hz, 4 H), 1,51-1,35 (m, 20 H). RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174,12, 167,24, 159,95, 156,03, 136,95, 105,61, 104,28, 79,26, 65,86, 51,55, 39,78, 37,78, 33,84, 29,47, 29,21, 28,41, 26,39, 24,44. MS (TOF ESI+) 596,8 (M+H).

Compuesto (9)

Se disolvieron 587 mg (0.99 mmol, 1 equivalente) de (8) en 5 ml de una solución al 20 % de ácido trifluoroacético en diclorometano y se agitaron a temperatura ambiente durante 2,5 horas. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se destiló azeotrópicamente con tolueno/metanol. Se continuó con el material sin ninguna purificación adicional. Tiempo de retención analítico del HPLC 4,77 min. RMN ^{1}H (400 MHz, D_2O) δ 6,77 (s, 2 H), 6,59 (s, 1 H), 4,02 (t, *J*= 5,7 Hz, 4 H), 3,22-3,14 (m, 5 H), 3,08 (t, *J*= 7,1 Hz, 4 H), 2,20 (t, *J*= 6,6 Hz, 2 H), 2,02 (dt, *J*= 12,7, 6,4 Hz, 4 H), 1,44 (d, *J*= 2,6 Hz, 4 H), 1,19 (dd, *J*= 14,6, 7,4 Hz, 2 H). RMN ^{13}C (101 MHz, D_2O) δ 178,76, 177,34, 169,73, 169,71, 162,89, 162,54, 159,24, 136,18, 117,65, 114,75, 106,06, 104,75, 65,79, 51,93, 48,77, 39,69, 37,32, 33,55, 33,42, 27,92, 27,87, 26,30, 25,52, 25,47, 23,83. MS (TOF ESI+) 418,5 (M+Na).

Compuesto (10)

Se disolvieron 660,4 mg (1,06 mmol, 1 equivalente) de (9), 1,548 g (2,65 mmol, 2,5 equivalentes) de Fmoc-dPEG$_4$-NHS y 553 ml (3,18 mmol, 3 equivalentes, Fluka 03440) de diisopropiletilamina en 5,3 ml de diclorometano y se agitaron a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción en bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (columna de gel de sílice de 50g Biotage SNAP, gradiente de acetato de etilo:metanol hasta 85:15). Se aislaron 577 g de un aceite de color pardo claro - 41 %. Tiempo de retención analítico del HPLC 10,51 min. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,75 (d, *J*= 6,7 Hz, 2 H), 7,60 (d, *J*= 6,2 Hz, 2 H), 7,50-7,35 (m, 3 H), 7,30 (d, *J*= 6,4 Hz, 2 H), 6,97 (s, 1 H), 6,50 (s, 1 H), 4,32 (d, *J*= 5,8 Hz, 2 H), 4,21 (d, *J*= 5,4 Hz, 1 H), 3,98 (s, 2 H), 3,62 (d, *J*= 19,2 Hz, 20 H), 3,42 (dd, *J*= 31,9, 4,0 Hz, 11 H), 3,12 (s, 2 H), 2,53 (d, *J*= 23,4 Hz, 4 H), 2,29 (s, 1 H), 1,94 (s, 2 H), 1,62 (d, *J*= 6,6 Hz, 3 H), 1,41 (dd, *J*= 17,6, 5,6 Hz, 11 H). RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174,20, 167,34, 161,85, 161,51, 159,91, 157,34, 143,93, 141,22, 136,80, 127,70, 127,08, 125,16, 119,94, 115,39, 105,82, 70,05, 69,80, 67,55, 66,79, 65,90, 53,62, 51,50, 50,62, 47,12, 41,98, 40,61, 39,90, 36,60, 33,88, 29,13, 28,74, 26,47, 25,28, 24,54, 18,53, 17,40, 11,80. MS (TOF ESI+) 1334,8 (M+H).

Compuesto (11)

Se disolvieron 577 mg (0,432 mmol, 1 equivalente) de (10) y 135 ml (0,9 mmol, 2,1 equivalentes) en 2 ml de *N,N*-dimetilformamida y se agitaron a durante toda la noche. El disolvente se eliminó al vacío, El residuo se disolvió en agua (50 ml) y se lavó con diclorometano (50 ml9 y acetato de etilo (50 ml). El material en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa (CH_3CN:TFA 0,05 % 10:90 en gradiente de H_2O hasta 90:10 a lo largo de 60 minutos). Rendimiento aislado, 23,4 % Tiempo de retención analítico del HPLC 5,37 min. MS (TOF ESI+) 890,6 (M+H). Las figs. 18 y 19 representan respectivamente los espectros de RMN ^{13}C y ^{1}H del compuesto (11).

Compuesto (12)

Se disolvieron 89,9 mg (0,08 mmol, 1 equivalente) de (11), 110,3 mg (0,201 mmol, 2,5 equivalentes) de (2) y 42 ml (0,241 mmol, 3 equivalentes) de diisopropiletilamina en 3 ml de diclorometano y se agitaron a temperatura ambiente durante toda la noche. El material en bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa preparativa (CH_3CN:TFA 0,05 % 30:70 isocrático). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,70 (d, *J*= 48,5 Hz, 7 H), 7,50 (s, 1 H), 6,91 (s, 2 H), 6,51 (s, 1 H), 3,98 (s, 4 H), 3,85-3,49 (m, 34 H), 3,38 (s, 6 H), 3,13 (s, 3 H), 2,51 (s, 3 H), 2,32 (t, *J*= 7,4 Hz, 2 H), 1,95 (s, 4 H), 1,71-1,56 (m, 4 H), 1,44-1,33 (m, 2 H). RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174,23, 172,48, 167,96, 161,29, 160,92, 160,55, 160,18, 160,01, 136,50, 120,33, 117,45, 114,56, 111,68, 105,69, 104,70, 70,12, 70,06, 69,93, 69,85, 69,71, 69,60, 67,46, 66,82, 65,79, 53,46, 51,49, 40,01, 39,53, 36,51, 36,08, 33,84, 28,96, 28,70, 26,41, 24,48. MS (TOF ESI+) 1756,9 (M+H).

El compuesto 13 puede sintetizarse hidrolizando el éster metílico del compuesto 12 en condiciones alcalinas usando métodos bien establecidos, p. ej., hidróxido de litio. El compuesto 13 puede convertirse al compuesto 14 usando las mismas condiciones y reactivos usados para sintetizar los compuestos 2, 4 y 6.

Ejemplo 5

Evaluación de la sonda HER2 DNA y de la sonda Chromosome 17 sobre portaobjetos HER2 3-in-1 Xenografts usando QD490:NDI-C6

Protocolo de tinción:

Aunque el protocolo de tinción de ADN que se presenta a continuación se refiere a las sondas *HER2* DNA (Ventana Medical Systems, Inc. (VMSI) n.º de cat. 780-4332) y/o Chromosome 17 (VMSI n.º de cat. 780-4331) sobre

portaobjetos *HER2* 3-in-1 Xenografts (VMSI n.º de cat. 783-4332) en conjunto con QD490:NDI-C6, puede generalizarse para incluir todos los ensayos con sondas génicas. El protocolo puede variarse según sea necesario, dependiendo de la sonda génica y el tipo de tejido. El siguiente es el procedimiento adaptado a partir del VMSI Benchmark® XT Instrument:

1. El tejido fijado en formalina e incluido en parafina del portaobjetos se calentó a 75 ºC durante 4 minutos y se trató dos veces con EZPrep™ (10X, VMSI n.º 950-102), se ajustó el volumen a 75 ºC antes de la aplicación de Liquid Coverslip™ (VMSI n.º 650-010). Después el portaobjetos se calentó a 76°C durante 4 minutos, el portaobjetos se aclaró y se ajustó el volumen con EZPrep™, seguido de Liquid Coverslip™ para desparafinar el tejido. El portaobjetos se enfrió a 37 ºC, se incubó durante 4 minutos y se aclaró una vez con tampón de reacción (10X, VMSI n.º 950-300).
2. El portaobjetos se calentó después a 95 ºC y se pretrató con Cell Condition n.º 2 (CC2 VMSI n.º 950-123) durante tres ciclos de 8, 12, y 8 minutos seguidos por una aplicación corta del Liquid Coverslip™ después de cada ciclo. El calentador de portaobjetos se deshabilitó y el portaobjetos se aclaró tres veces con tampón de reacción seguidas de una aplicación de Liquid Coverslip™ cada vez.
3. El portaobjetos se calentó a 37 ºC, se incubó durante 4 minutos y se aclaró una vez con tampón de reacción. Se aplicó ISH-Protease 3 durante 8 minutos y se aclaró dos veces con tampón de reacción.
4. El portaobjetos se aclaró dos veces con SSC (10X, VMSI n.º 950-110).
5. Se aplicó una gota de solución de detección de hibridación *in situ* con plata (SISH por sus siglas en inglés) (un componente del *kit* VMSI SISH Detection Kit n.º 780-001) y se incubó durante 4 minutos.
6. Se aplicaron dos gotas de sonda *HER2* DNA marcada con DNP (VMSI n.º 780-4332) o la sonda Chromosome 17 marcada con DNP (VMSI n.º 780-4331) y se incubó durante 4 minutos, y después se calentó el portaobjetos a 95 ºC durante 12 minutos para la desnaturalización del ácido nucleico. (DNP = siglas en inglés de 2,4-dinitrofenol)
7. Después de la incubación de 12 minutos, se realizó una aplicación corta de Liquid Coverslip™ y el portaobjetos se hibridó a 52 ºC durante 2 horas al usar la sonda *HER2* DNA, o a 44 °C durante 2 horas al usar la sonda Chromosome 17 probe.
8. Después de la hibridación de la sonda, el portaobjetos se aclaró en SSC dos veces y se sometió a tres lavados con rigurosidad de SSC 2,0 X a 72 ºC durante 8 minutos cada uno, tras los cuales se dejó enfriar el portaobjetos.
9. El portaobjetos se aclaró en tampón de reacción y se calentó a 37 ºC durante 4 minutos. Después, se aplicó una gota de QD655:anti DNP de ratón con Liquid Coverslip™ a los dos portaobjetos con las sondas y se incubó durante 32 minutos a 37 ºC.
10. El portaobjetos se sometió después a 3 aclarados con tampón de reacción antes de incubar el QD490:NDI C6 sobre el portaobjetos durante 32 minutos con Liquid Coverslip™ a temperatura ambiente.
11. El portaobjetos se retiró del equipo y se lavó dos veces con tampón de reacción. Los portaobjetos se deshidrataron después con alcohol graduado y xileno antes de la aplicación manual de un cubreobjetos.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, que comprende:

una nanopartícula; y
un resto de unión a ADN que comprende una molécula de unión a ADN y un engarzador,
en el que la molécula de unión a ADN es un agente de unión al surco menor, un agente de unión al surco mayor, un intercalante de ADN, un agente alquilante de ADN, o una combinación de los mismos, y en el que el conjugado tiene la estructura
nanopartícula-engarzador-molécula de unión a ADN.

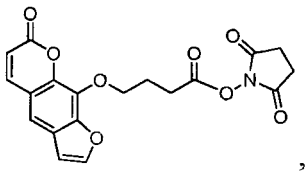
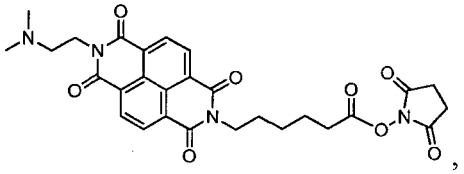
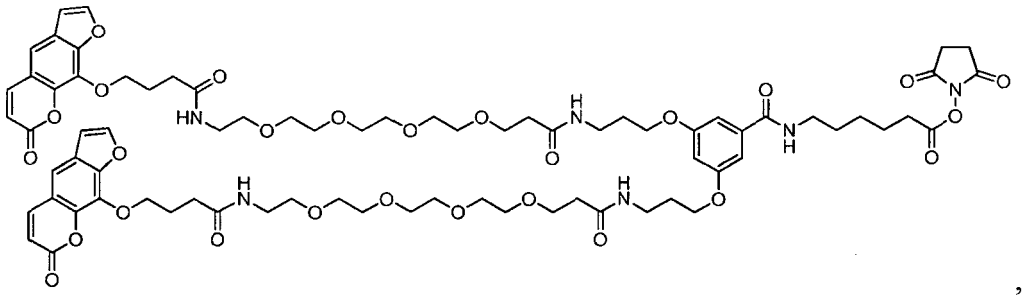
2. El conjugado de la reivindicación 1, en la que la nanopartícula comprende un punto cuántico, una nanopartícula metálica, una nanopartícula de óxido metálico, o una nanopartícula de complejo de metal de transición.

3. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el resto de unión a ADN comprende una molécula de unión a ADN seleccionada de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), colorantes de bis-bencimida, psoraleno y naftalendiimida.

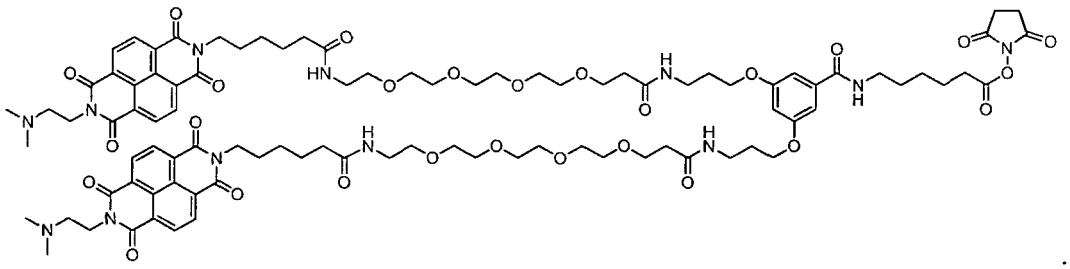
4. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el engarzador comprende una cadena alifática de 1 a 30 átomos de carbono de longitud o $(-OCH_2CH_2-)_n$ en la que n es de 2 a 15.

5. El conjugado de la reivindicación 1, en la que el engarzador es un engarzador multifuncional y una pluralidad de moléculas de unión a ADN se une al engarzador multifuncional.

6. El conjugado de la reivindicación 1, en la que el resto de unión a ADN es


,

,

,

o


.

7. Un método para visualizar un núcleo, que comprende:

pretratar una muestra de tejido con una proteasa para formar una muestra de tejido pretratada;
incubar la muestra de tejido pretratada con un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en condiciones suficientes para permitir que el conjugado entre en un núcleo dentro de la muestra de tejido pretratada, en el que el conjugado se une al ADN en el núcleo; y
visualizar la nanopartícula, y visualizar así el núcleo.

8. El método de la reivindicación 7, en la que la nanopartícula comprende un punto cuántico y visualizar la nanopartícula comprende visualizar la fluorescencia fotoestable del punto cuántico.

9. El método de la reivindicación 7, en la que el conjugado se incuba con la muestra de tejido a una concentración de al menos 20 nM.

10. El método de la reivindicación 7, que comprende además usar técnicas de análisis de imagen por ordenador para determinar de forma cuantitativa aspectos nucleares, opcionalmente en la que los aspectos nucleares incluyen distribución cromosómica, ploidía, forma, tamaño, aspectos de textura, aspectos contextuales, o combinaciones de los mismos.

11. El método de la reivindicación 7, en la que la muestra de tejido se pretrata con la proteasa durante 4-8 minutos y la muestra de tejido se fija antes de pretratar con la proteasa.

12. El método de la reivindicación 7, que comprende además:

proporcionar una sonda capaz de hibridar con una diana dentro de una muestra de tejido antes de incubar la muestra de tejido pretratada con el conjugado;
incubar la sonda con la muestra de tejido en condiciones suficientes para permitir que la sonda hibride con la diana dentro de la muestra de tejido; y
detectar la sonda.

13. El método de la reivindicación 12, en la que detectar la sonda comprende visualizar un punto cuántico asociado con la sonda, y en la que la nanopartícula del conjugado comprende un punto cuántico capaz de emitir fluorescencia a una longitud de onda diferente de la del punto cuántico asociado con la sonda.

14. El método de la reivindicación 7, que comprende además realizar un procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente sobre la muestra de tejido, opcionalmente en la que el procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente comprende un ensayo de *HER2,* un ensayo de TMPRSS2-ERG, un ensayo de Chr17, o una combinación de los mismos.

15. Un *kit* para visualizar un núcleo, que comprende:

una composición enzimática de proteasa que comprende una enzima proteasa y un tampón de proteasa, en la que el tampón de proteasa tiene una concentración de sal y un pH suficientes para permitir que la enzima proteasa presente actividad proteolítica;
un conjugado que comprende a) una nanopartícula y b) un resto de unión a ADN que comprende una molécula de unión a ADN; y
un tampón de reacción, en el que el tampón de reacción tiene una concentración de sal y un pH suficientes para posibilitar que el conjugado entre en un núcleo dentro de una muestra tejido pretratada con la composición enzimática de proteasa.

16. El *kit* de la reivindicación 15, en la que la nanopartícula comprende un punto cuántico, una nanopartícula metálica, una nanopartícula de óxido metálico, o una nanopartícula de complejo de metal de transición.

17. El *kit* de la reivindicación 15, en el que la molécula de unión a ADN es un agente de unión al surco menor, un agente de unión al surco mayor, un intercalante de ADN, un agente alquilante de ADN, o una combinación de los mismos.

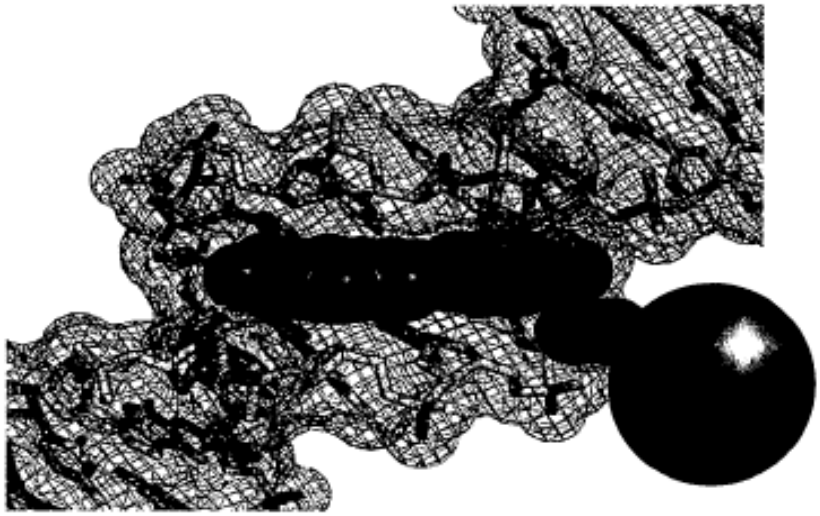


FIG. 1

FIG. 2

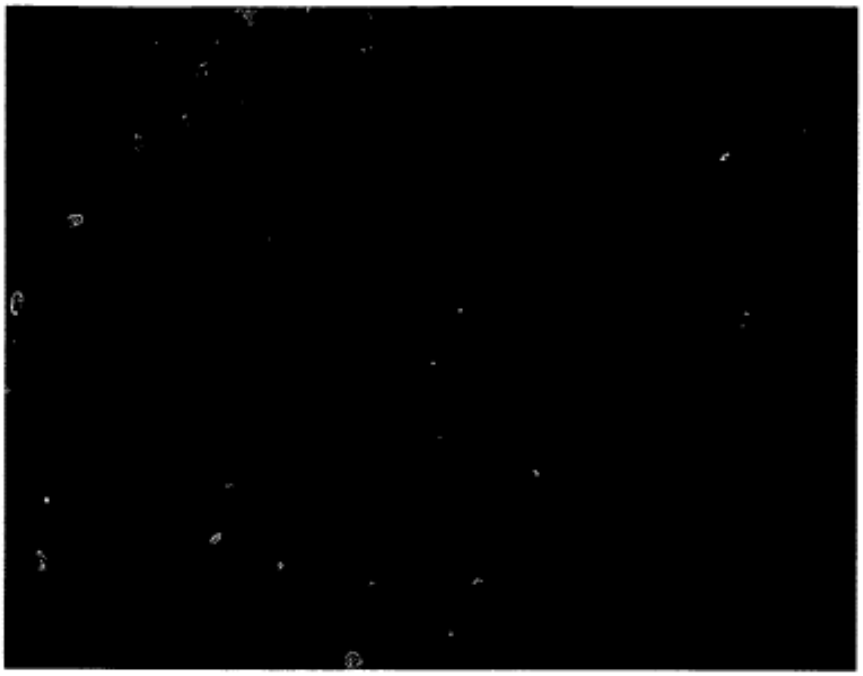


FIG. 3A

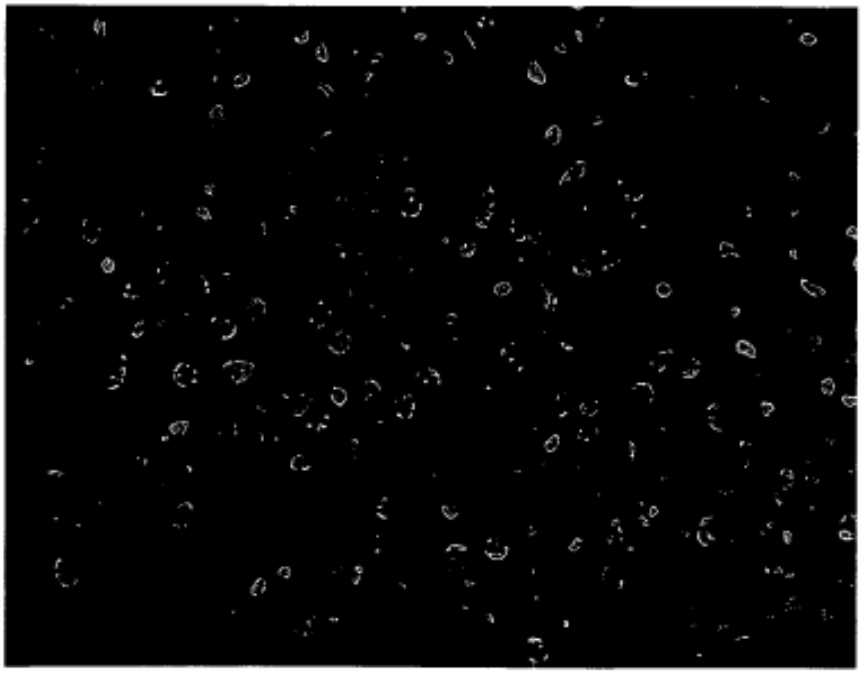


FIG. 3B

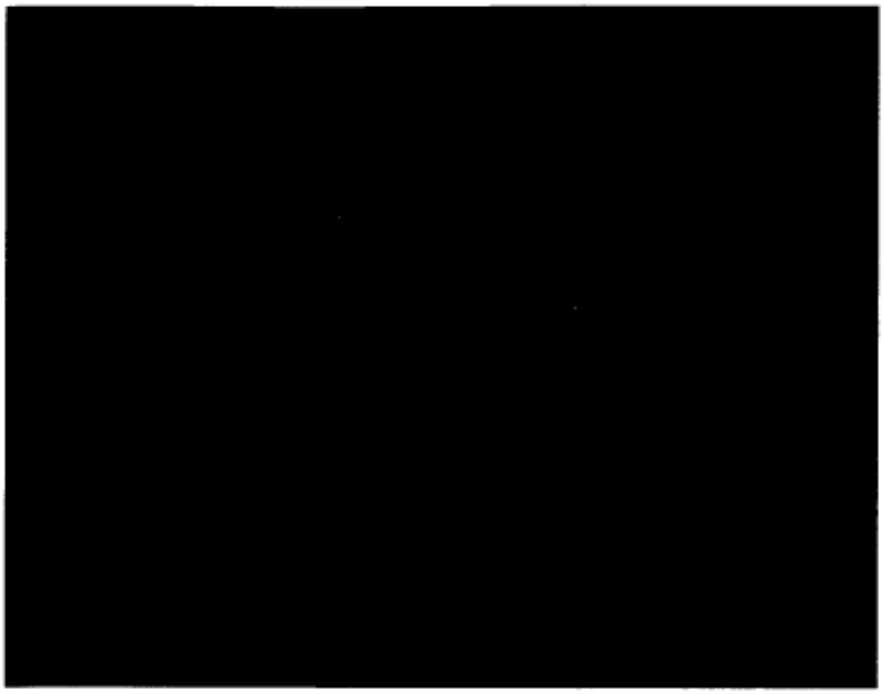


FIG. 4

FIG. 5

FIG. 6

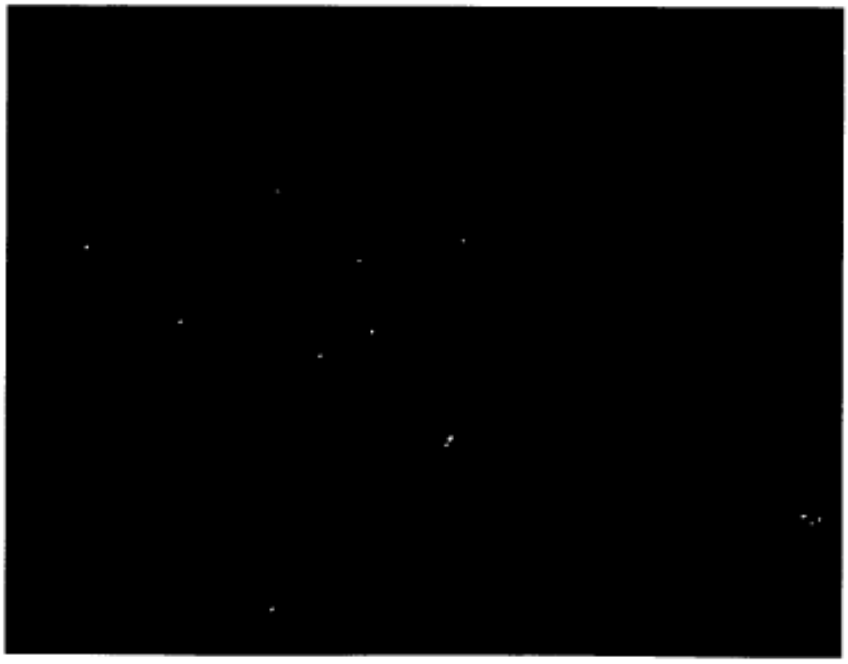


FIG. 7

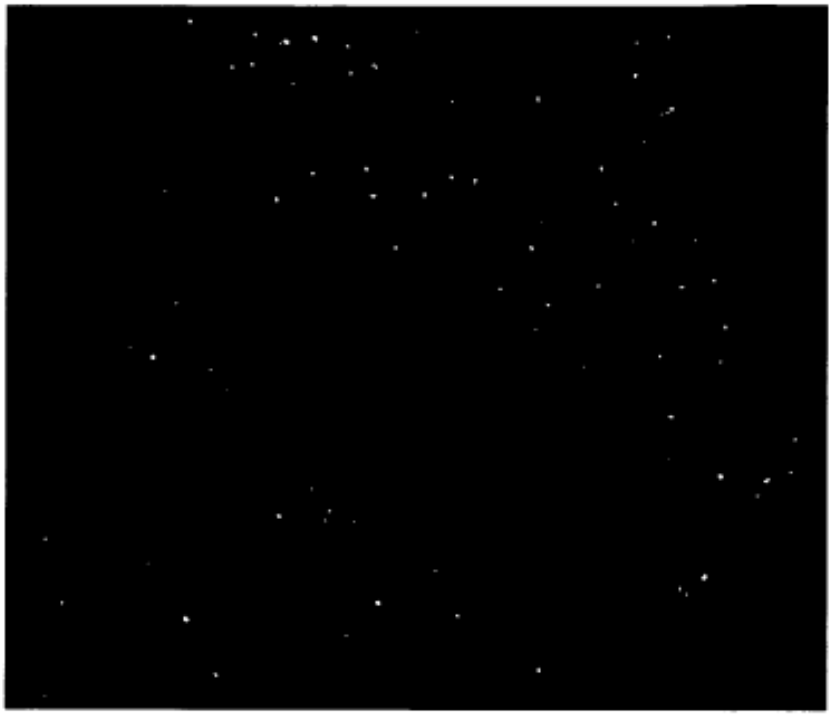


FIG. 8

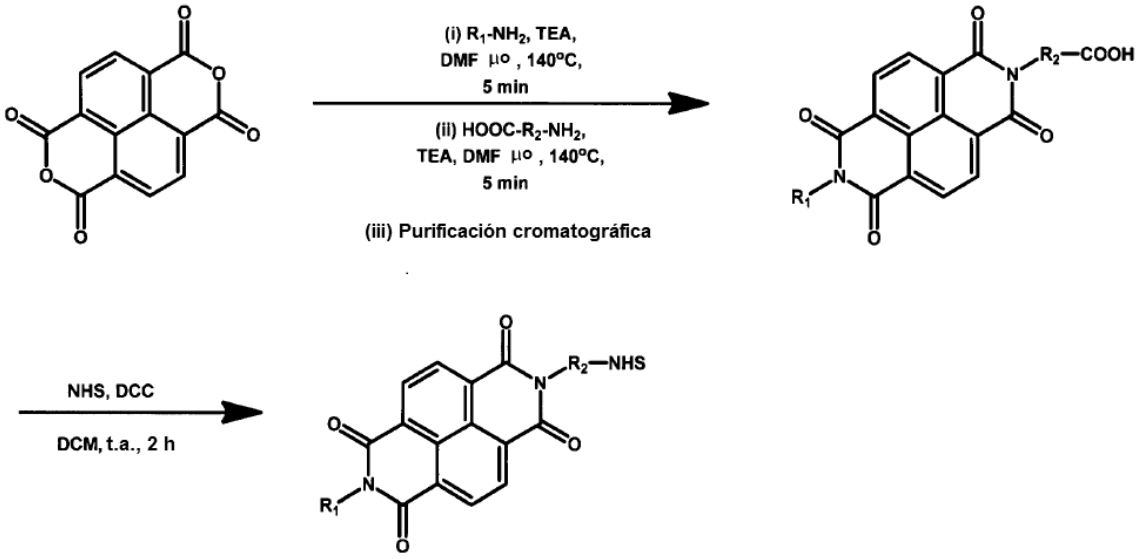

(i) R_1-NH_2, TEA,
DMF µo , 140°C,
5 min
(ii) HOOC-R_2-NH_2,
TEA, DMF µo , 140°C,
5 min
(iii) Purificación cromatográfica
R_2—COOH
NHS, DCC
DCM, t.a., 2 h
R_2—NHS

FIG. 9

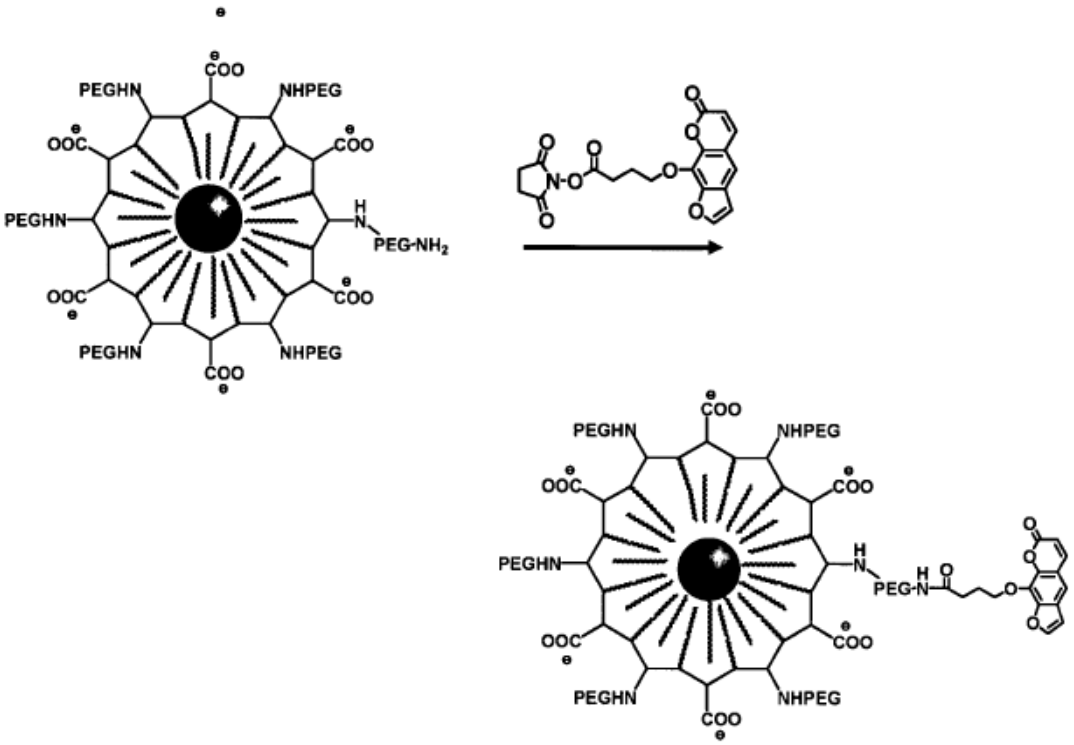

PEGHN
NHPEG
PEGHN
PEG-NH2
PEGHN
NHPEG
PEGHN
NHPEG
PEGHN
PEG-N
PEGHN
NHPEG

FIG. 10

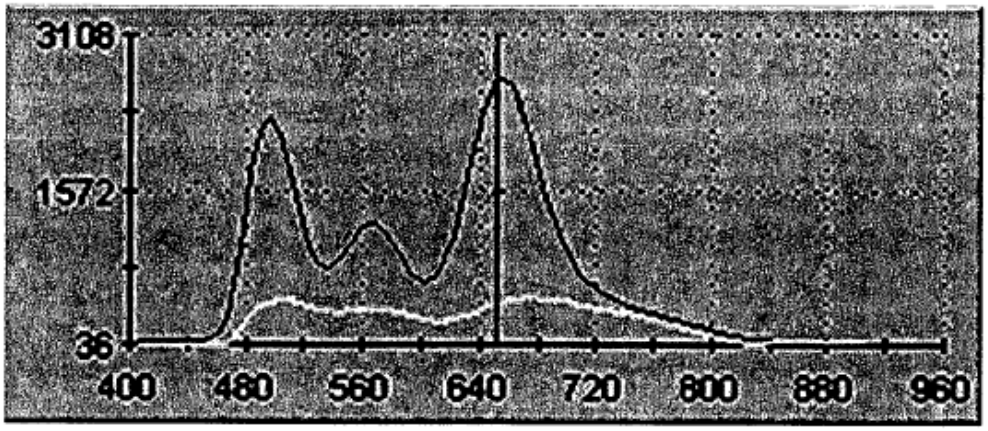


FIG. 11

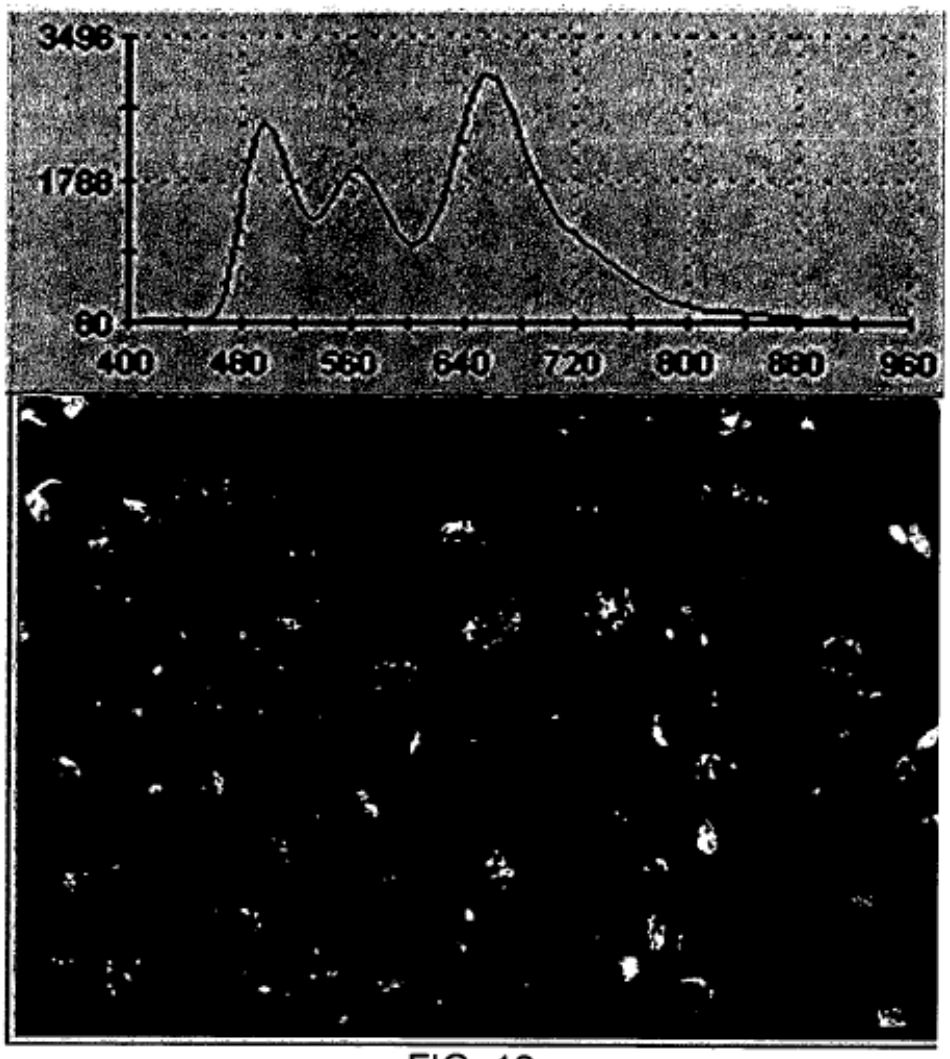


FIG. 12

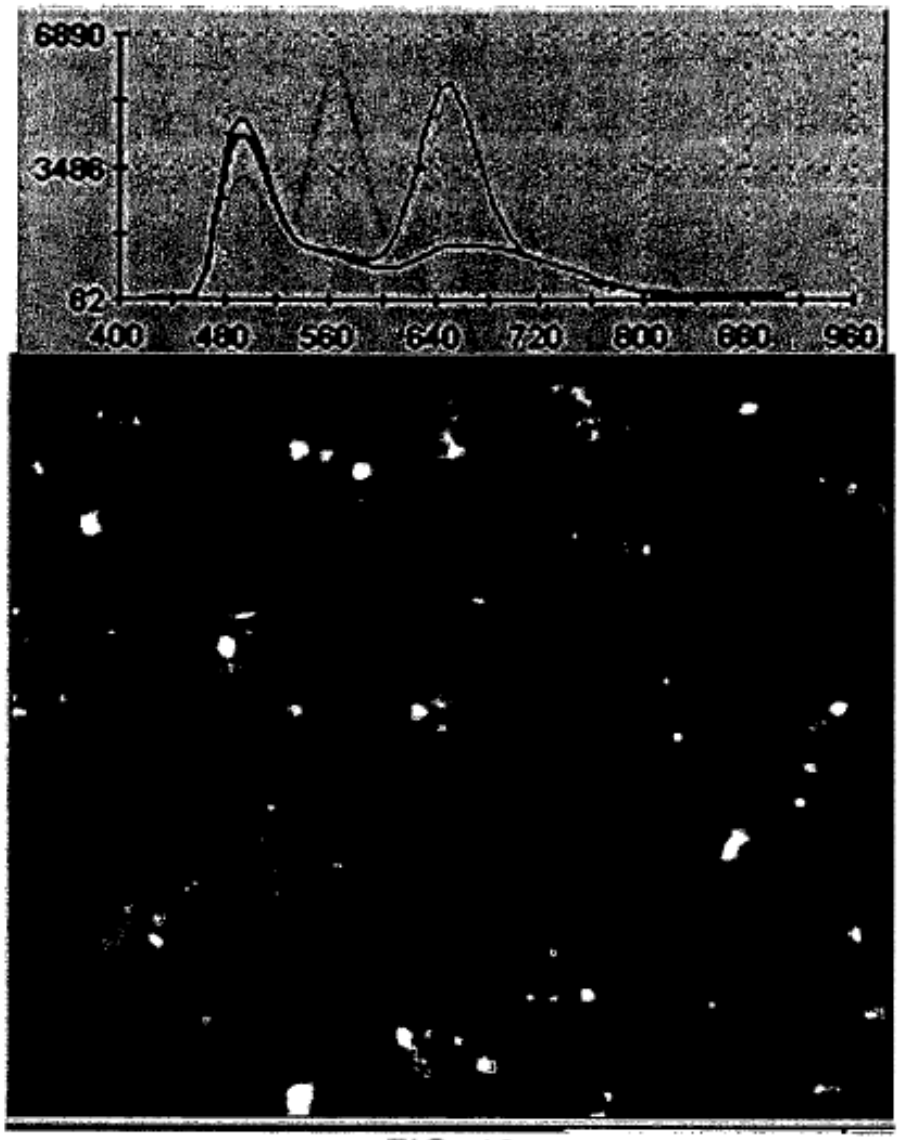


FIG. 13

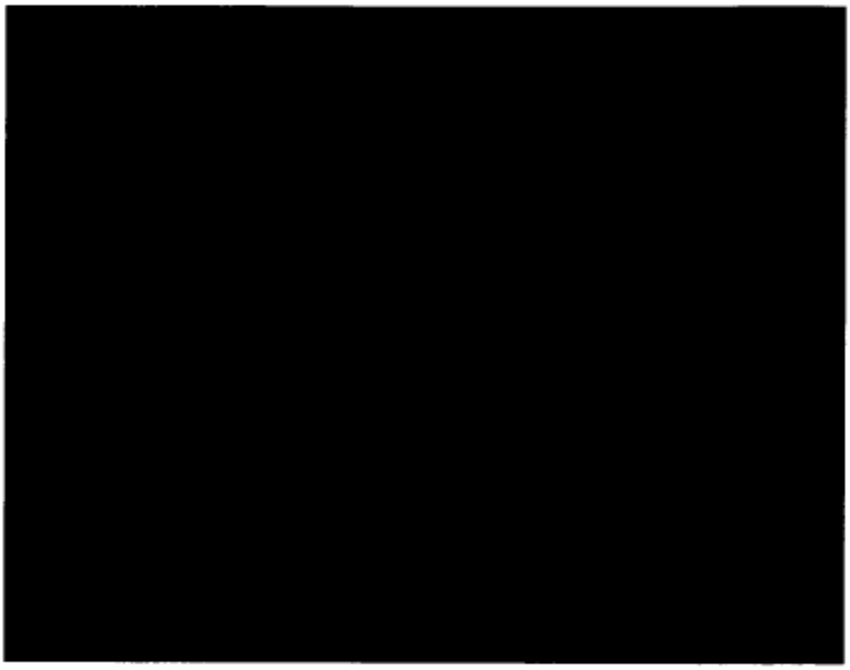


FIG. 14

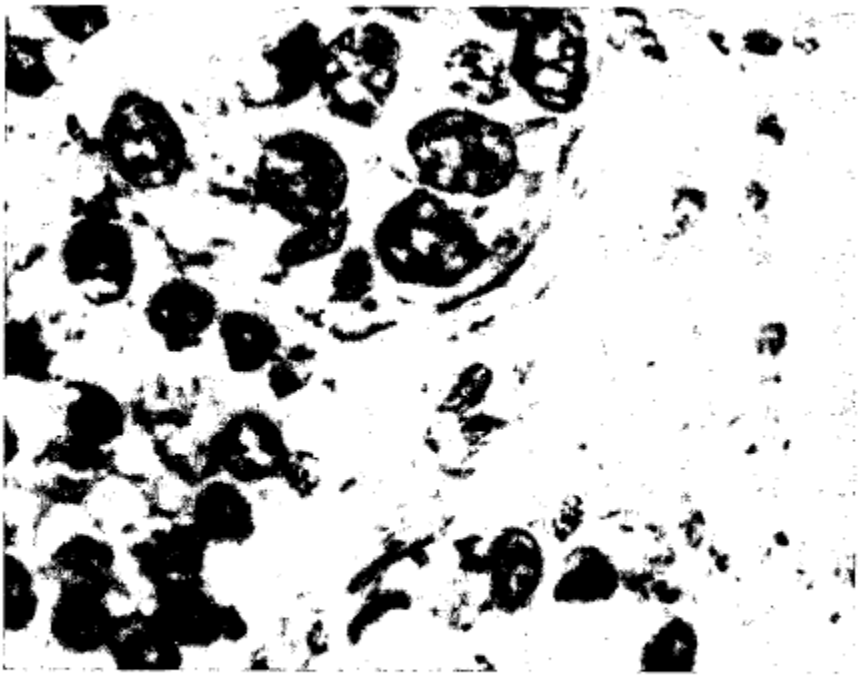


FIG. 15

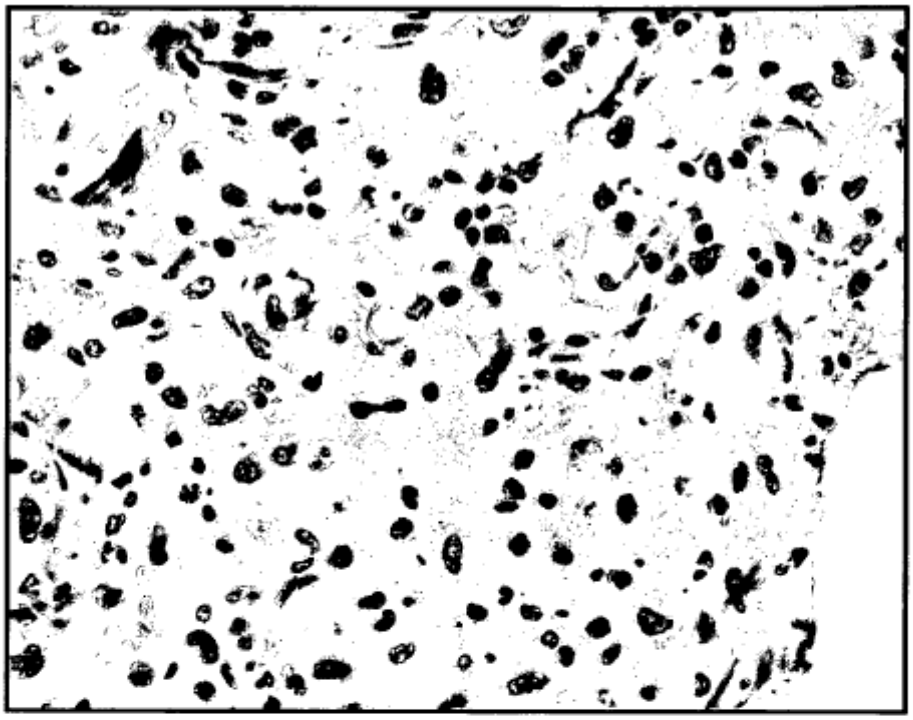


FIG. 16

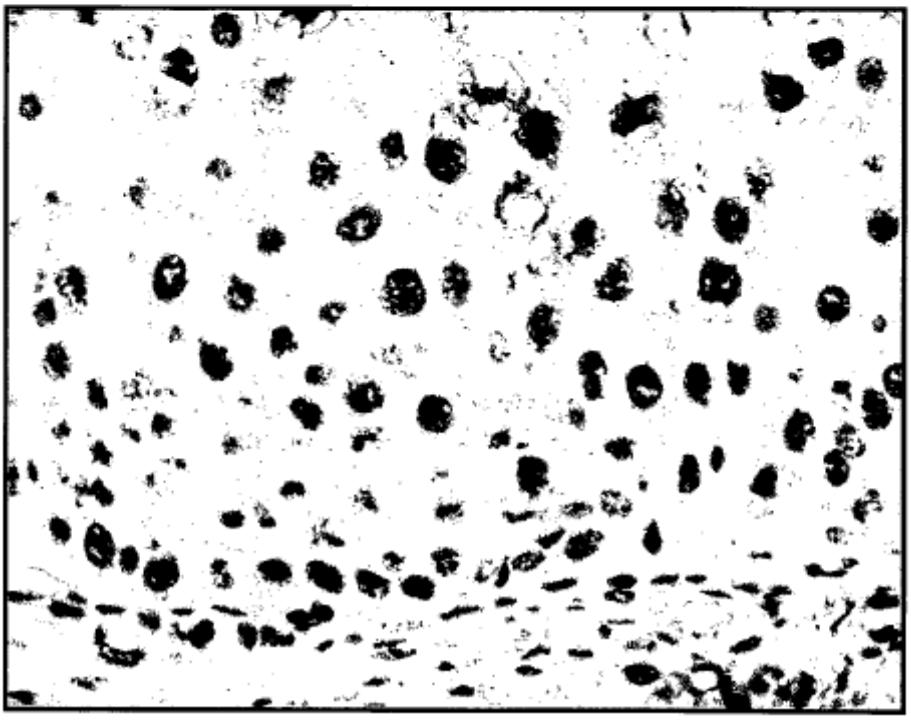


FIG. 17

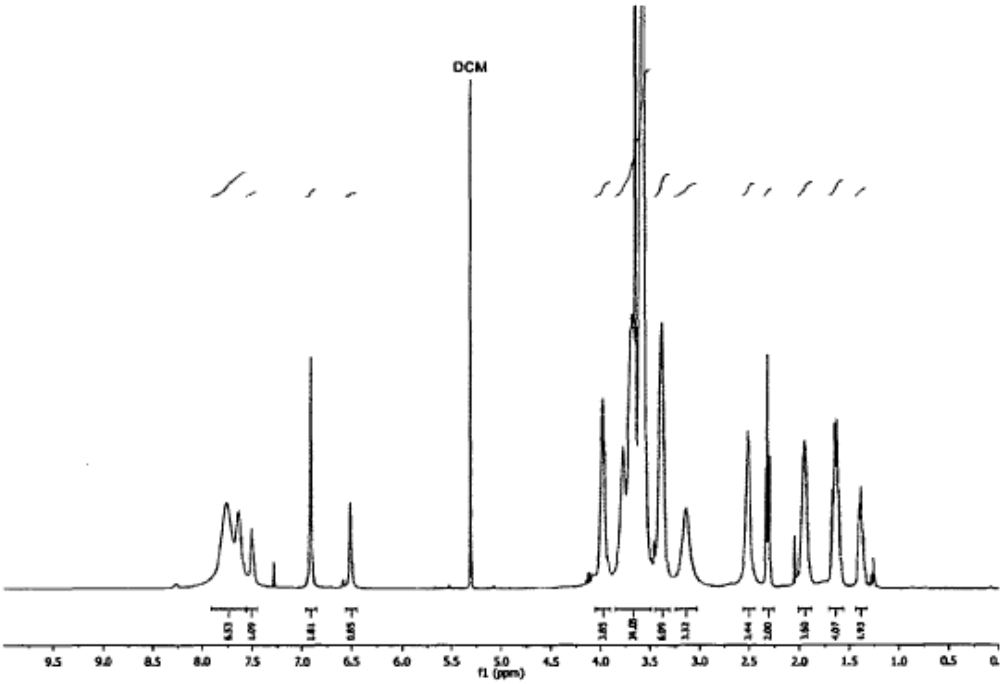


FIG. 18

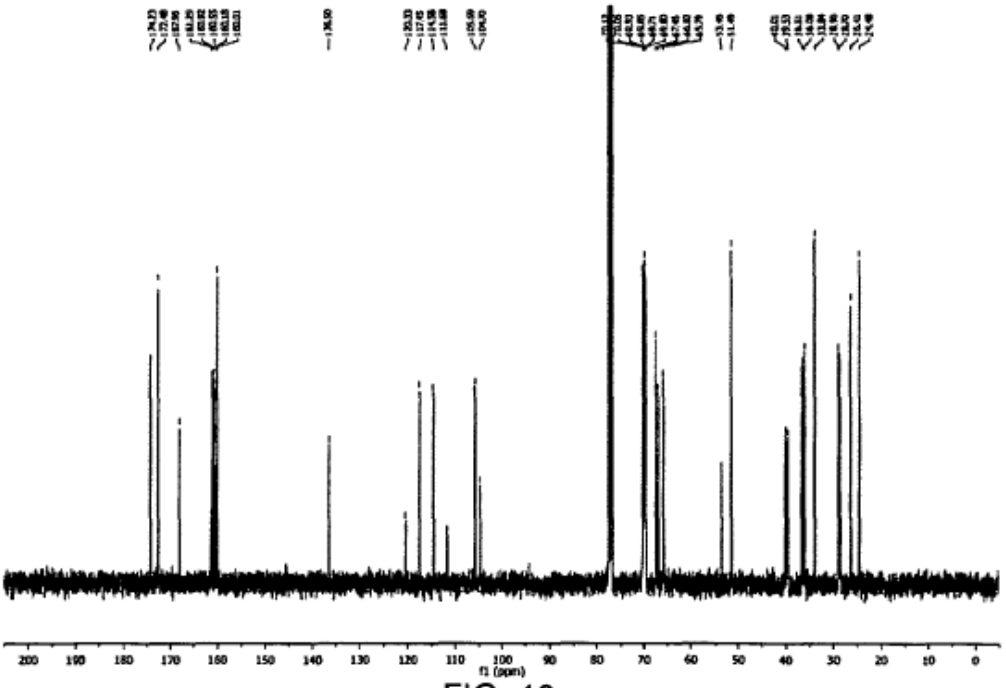


FIG. 19