

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 333**

51 Int. Cl.:

C09B 23/06 (2006.01)

C09B 23/08 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2006 PCT/DK2006/000661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2007 WO07059779**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2006 E 06805597 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 1954763**

54 Título: **Colorantes de cianina y métodos para detectar una diana usando dichos colorantes**

30 Prioridad:

28.11.2005 US 740074 P

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

23.03.2017

73 Titular/es:

**DAKO DENMARK A/S (100.0%)
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK**

72 Inventor/es:

PETERSEN KENNETH H.

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 606 333 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Colorantes de cianina y métodos para detectar una diana usando dichos colorantes

Campo técnico

- 5 Esta invención se refiere a compuestos que pueden usarse tanto como cromógeno y como fluorocromo, así como a métodos para detectar una diana usando dichos compuestos.

Antecedentes de la invención

La detección y cuantificación de material biológico, tal como células, proteínas, por ejemplo citocinas y anticuerpos, fármacos, ácido nucleico, por ejemplo ADN y ARN, etc., usando marcaje fluorescente o cromógenos procesados por enzimas se aplica ampliamente en diferentes sistemas de ensayo biológico.

- 10 El colorante fluorescente es particularmente útil para ensayos como inhumohistoquímica (IHC), citometría de flujo, hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y sistemas similares. Los colorantes fluorescentes, o fluorocromos, son fluorescentes cuando se excitan apropiadamente en condiciones normales de uso. Los cromógenos tienen características diferentes de los fluorocromos y forman precipitados coloreados cuando se procesan por una enzima. En condiciones normales de uso, los cromógenos forman precipitados intensamente coloreados cuando se observan usando condiciones de iluminación habituales. Se usan frecuentemente cromógenos en IHC, y sistemas de inmunoensayo ligados a enzimas similares.

- 15 La mayoría de los ensayos ligados a enzimas se basan en una de las dos enzimas fosfatasa alcalina (AP), una hidrolasa (Self CH, *J Imm Methods* 76:389-393, 1985) o peroxidasa del rábano (HRP), una oxidoreductasa (Bystryak, Mekler, *Anal Biochem* 202:390-393, 1992). La actividad fosfatasa alcalina se expresa en general a través de la hidrólisis de un sustrato indicador y su posterior reacción con una sal de diazonio para generar una señal detectable. La HRP oxida un sustrato indicador y este sustrato indicador, a través de polimerización o unión covalente, generará una señal detectable.

- 20 Se conocen bien colorantes de cianina y colorantes de polimetina relacionados en la bibliografía (Tyutyulkov, N., *et al.*, *Polymethine dyes: Structure and properties*. 1ª ed. 1991: St. Kliment Ohridski University press. 249). Además, también se han sugerido modificaciones de los colorantes para proporcionar solubilidad, reactividad y propiedades espectroscópicas deseadas (Tyutyulkov, N., *et al.*, *Polymethine dyes: Structure and properties*. 1ª ed. 1991: St. Kliment Ohridski University press. 249).

- 30 Se han descrito previamente colorantes de cianina como sustrato para enzimas, sin embargo sólo en sistemas en los que los colorantes se acoplan a una molécula que se sabe que es un sustrato para una enzima (en este caso peroxidasa del rábano (HRP)). Chao *et al.* (*Cytometry* 23:48-53, 1996) describen un sustrato de peroxidasa del rábano fluorescente, Cy3.29-tiramida, y su aplicación en un sistema de amplificación de la señal basado en enzimas (deposición de indicador catalizada, CARD).

El documento EP 747 448 describe compuestos de colorantes rigidizados de monometina fluorescentes que emiten en la región del espectro de UV cercano y azul (300-500 nm).

- 35 El documento US 6.686.145 describe compuestos de colorantes rigidizados fluorescentes que pueden producir fluorescencia en la región de verde a naranja del espectro.

El documento US 5.268.486 describe colorantes de cianina y polimetina desarrollados con grupos sustituyentes que son reactivos covalentemente con grupos sulfhidrilo, grupos amina y grupos hidroxilo sobre proteínas y otros materiales para fines de detección de la fluorescencia y fosforescencia de esos materiales.

- 40 El documento US 5.569.587 describe el marcaje de proteínas, ADN, fármacos, células sanguíneas, etc. con colorantes de polimetina-cianina y polimetina luminiscentes en un sitio de amina o hidroxilo en esos materiales.

Ratnakar *et al.*, *Cytometry*, vol. 10, 1989, 11-19 dan a conocer reactivos de marcaje de colorante de cianina que contienen grupos isotiocianato.

- 45 El documento EP 0 747 700 da a conocer complejos de marcaje fluorescentes formados mediante el acoplamiento de cianina y otros fluorocromos que pueden transferir energía por resonancia.

El documento WO 00/75237 da a conocer colorantes de cianina para investigaciones biológicas mediante la detección de la fluorescencia.

El documento US 2003/170762 da a conocer compuestos de acridina útiles en los métodos y las composiciones para generar quimioluminiscencia.

- 50 El análisis complejo de material biológico exige el análisis en paralelo de varias moléculas biológicas para obtener la información deseada. Los sistemas de ensayo actuales están a menudo limitados en su mayoría por el número de

colores disponibles para realizar tal análisis de varios marcadores en diferentes colores sobre una sección de tejido.

Por tanto es altamente deseable desarrollar medios y métodos para que estén disponibles más colores en ensayos biológicos para permitir por ejemplo el análisis en paralelo de moléculas y marcadores biológicos, y para permitir la manipulación del color del colorante para adecuarse a las necesidades específicas del usuario, tales como necesidades de color específicas o la elección de los sistemas de detección visual o de fluorescencia, de un modo fácil y sencillo. En este sentido la presente invención aborda esta necesidad e interés.

5

Sumario de la invención

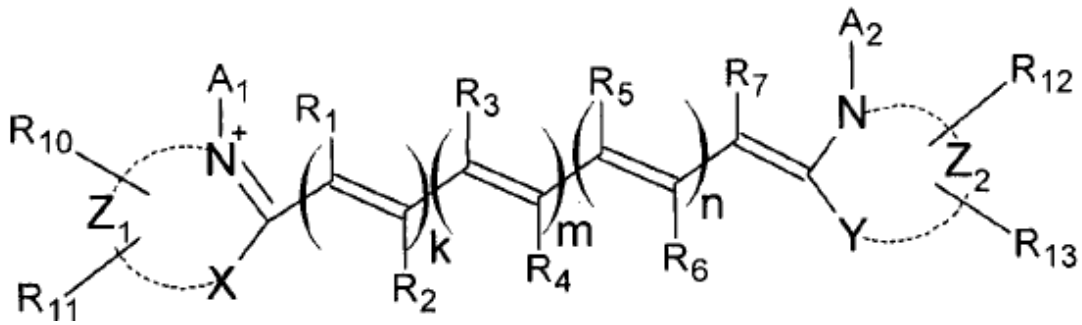
En vista de las necesidades e intereses anteriores con respecto al análisis de moléculas y marcadores biológicos, particularmente el análisis de varios marcadores en paralelo en una muestra tal como sobre una sección de tejido, que permite el uso de más colores en dichos ensayos, la presente invención proporciona compuestos que pueden usarse tanto como excelentes cromógenos y fluorocromos.

10

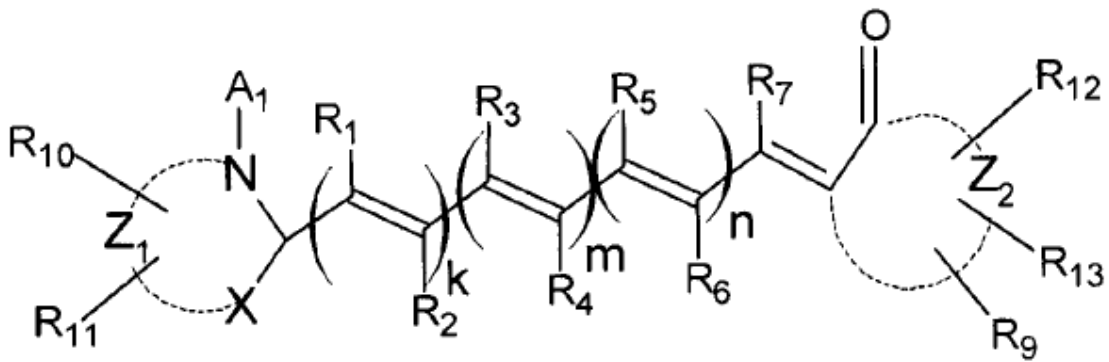
Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos según las fórmulas X-XII como cromógeno, o como fluorocromo, o como ambos.

Las realizaciones de la invención son

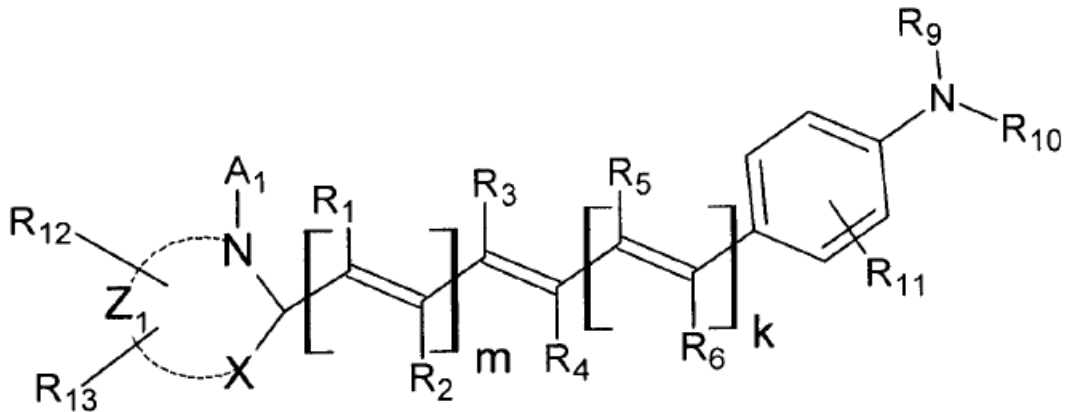
15 a) Uso de un compuesto según la fórmula



Fórmula X, o



Fórmula XI, o



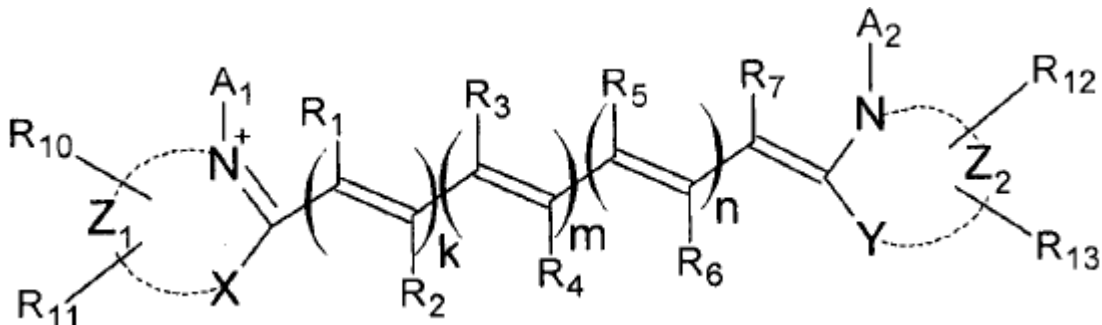
Fórmula XII,

en el que

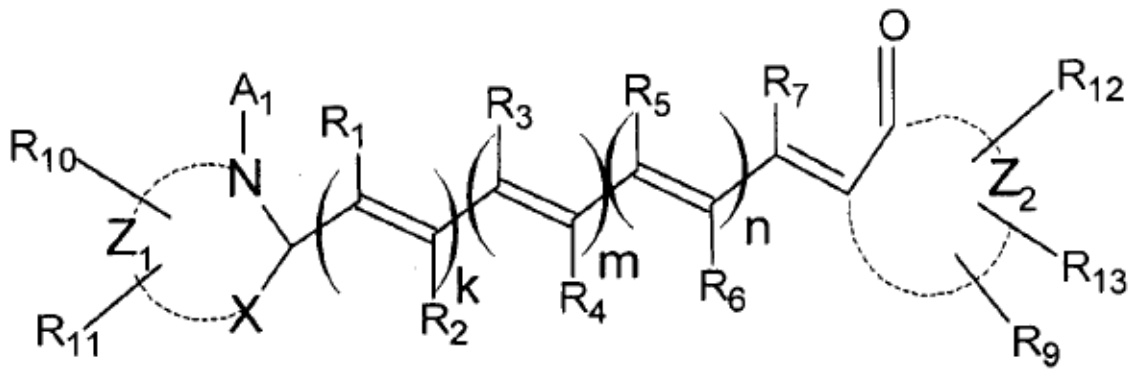
- 5 - las líneas discontinuas Z₁ y Z₂ representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada de los grupos que consisten en un anillo, dos anillos condensados, y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático (-NH₂), o al menos un grupo hidroxilo aromático (-OH), o al menos un grupo fosfato aromático (-PO₄), o una mezcla de los mismos, unidos,
- k y m y n son independientemente 1 ó 0,
- 10 - R₁ a R₁₃ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -D y -(B)ⁱ-(D)^j,
- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂- o -CH=CH-, y
- A₁ y A₂ se seleccionan del grupo que consiste en -D y -(B)ⁱ-(D)^j
- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,
- B es un ligador,
- 15 - D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

como sustrato para al menos una enzima en el que la al menos una enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP).

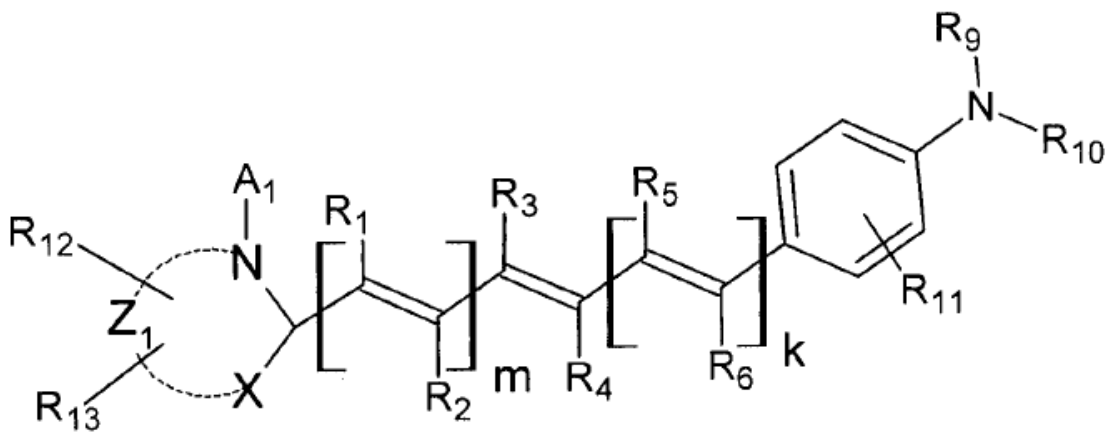
b) Un método para precipitar un compuesto según la fórmula



Fórmula X, o

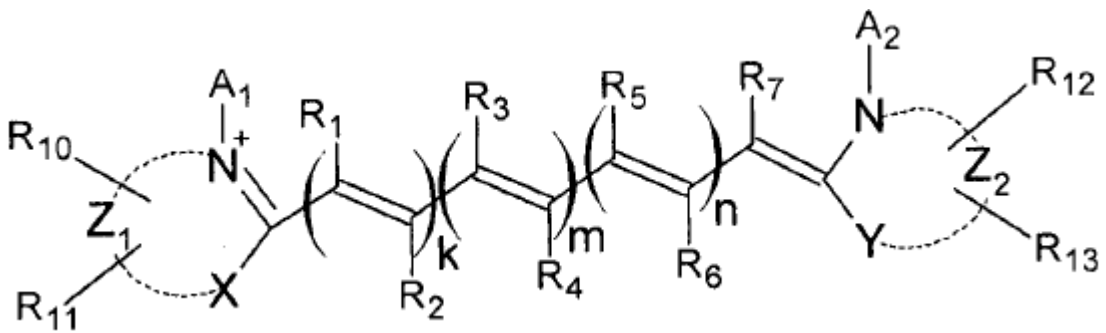


Fórmula XI, o

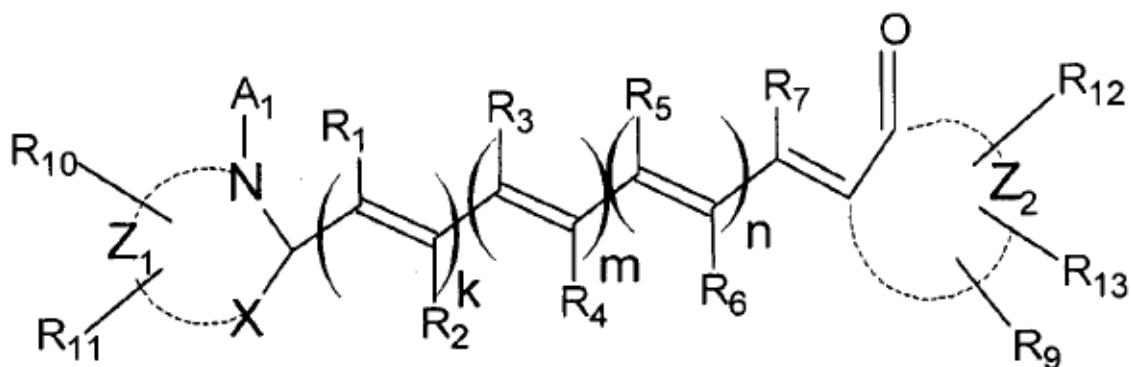


Fórmula XII,

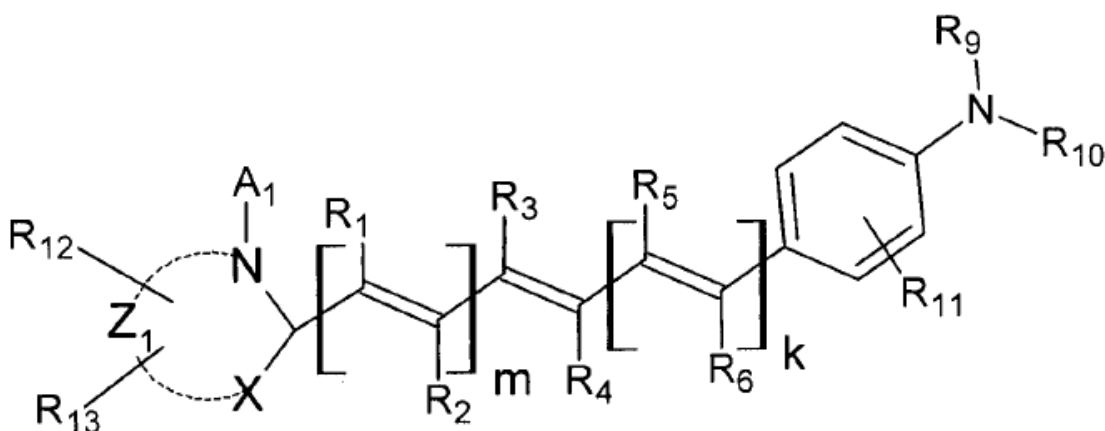
- 5 comprendiendo el método las etapas de
 a) proporcionar dicho compuesto según la fórmula



Fórmula X, o



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

5 en el que en las fórmulas X-XII

- las líneas discontinuas Z_1 y Z_2 representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada del grupo que consiste en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático ($-NH_2$), o al menos un grupo hidroxilo aromático ($-OH$), o al menos un grupo fosfato aromático ($-PO_4$), o una mezcla de los mismos, unidos,

10

- k y m y n son independientemente 1 ó 0,

- R_1 a R_{13} se seleccionan individualmente del grupo que consiste en $-(D)_j$ y $-(B)_i-(D)_j$,

- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, $-C(CH_3)_2-$ o $-CH=CH-$, y

- A_1 y A_2 se seleccionan del grupo que consiste en $-(D)_j$ y $-(B)_i-(D)_j$,

15

- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,

- B es un ligador,

- D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

b) proporcionar una enzima, en el que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

20

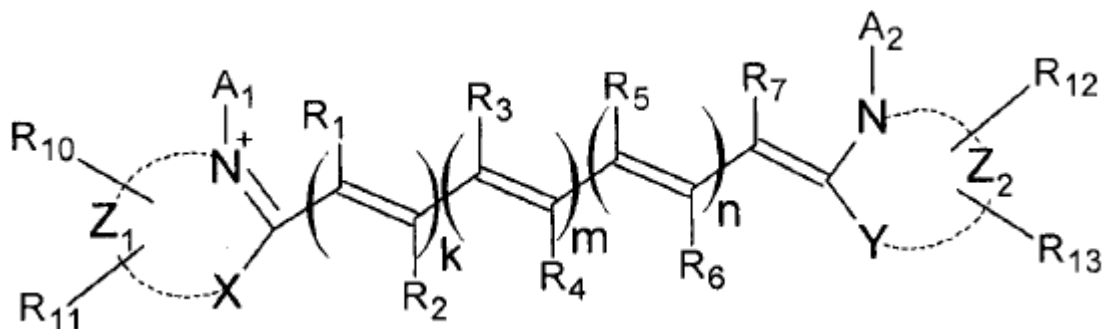
c) poner en contacto el compuesto según la invención con dicha enzima,

d) opcionalmente proporcionar un cofactor,

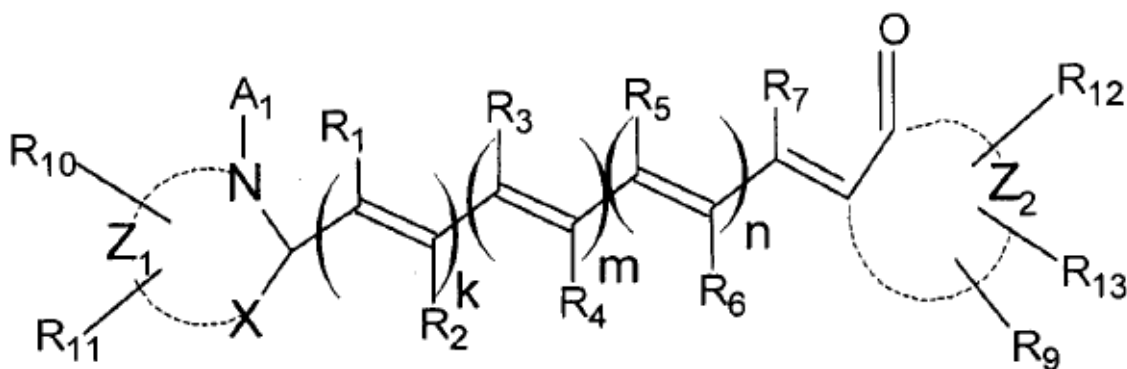
en el que dicho compuesto forma un precipitado.

c) Un método para detectar una diana, comprendiendo el método las etapas de

a) proporcionar al menos un compuesto según la fórmula

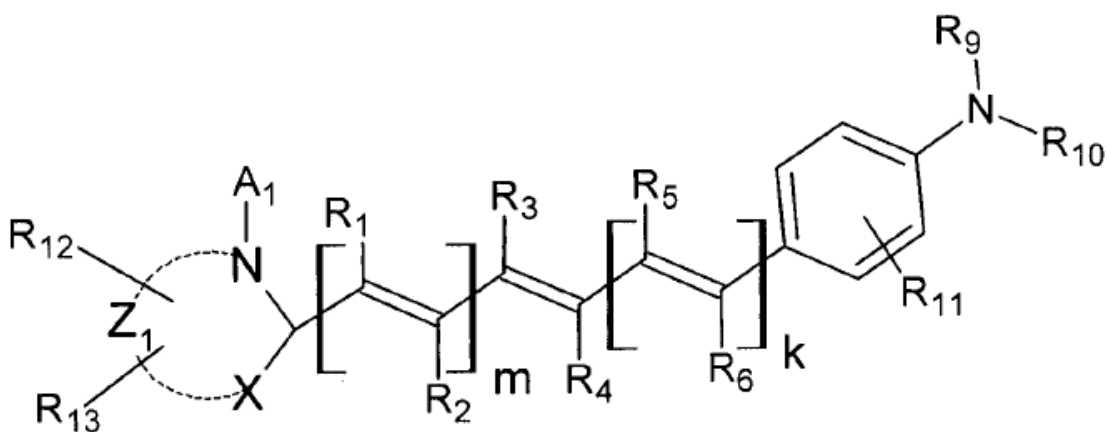


Fórmula X, o



Fórmula XI, o

5



Fórmula XII,

en el que en las fórmulas X-XII

- 10 -las líneas discontinuas Z₁ y Z₂ representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada del grupo que consiste en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático (-NH₂), o al menos un grupo hidroxilo aromático (-OH), o al menos un grupo fosfato aromático (-PO₄), o una mezcla de los mismos, unidos,
- k y m y n son independientemente 1 ó 0,
- 15 - R₁ a R₁₃ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -(D)_j y -(B)_i-(D)_j,
- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂- o -CH=CH-, y
- A₁ y A₂ se seleccionan del grupo que consiste en -(D)_j y -(B)_i-(D)_j,

- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,

- B es un ligador,

- D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

5 b) proporcionar al menos una enzima, en el que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

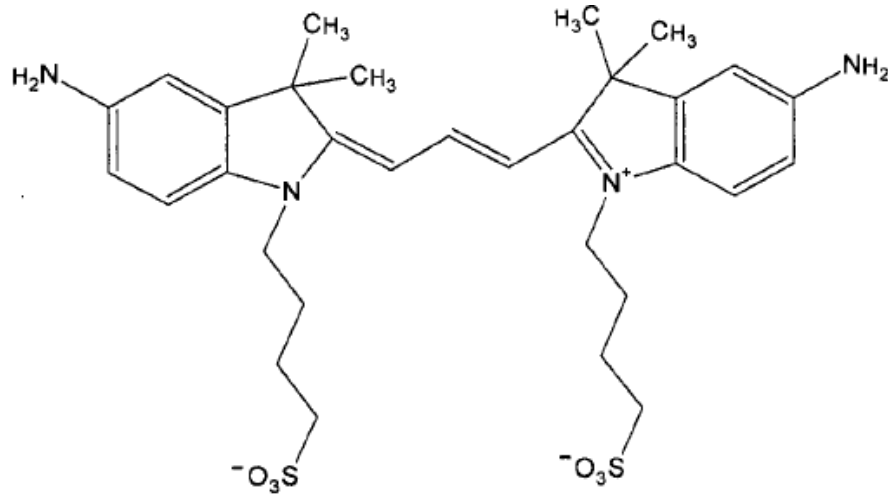
c) poner en contacto el compuesto según la invención con dicha enzima,

d) opcionalmente proporcionar un cofactor, y

e) detectar dicho precipitado,

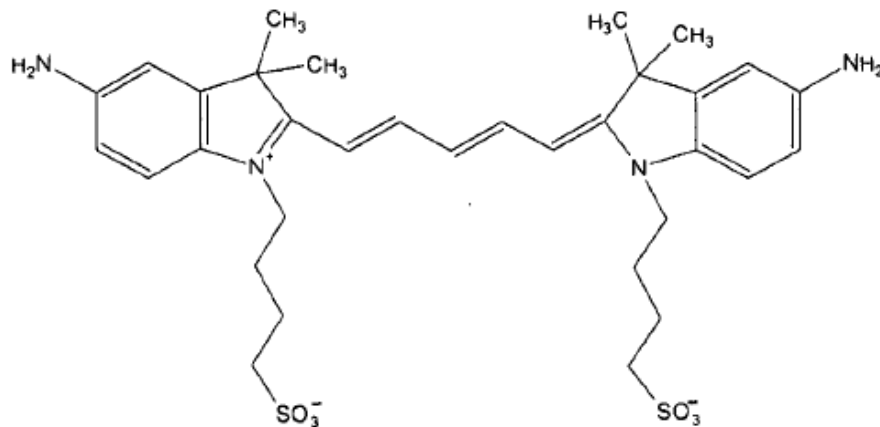
10 en el que la detección de dicho precipitado es una detección directa o indirecta de dicha diana.

d) Un compuesto según la fórmula



Fórmula IIIa.

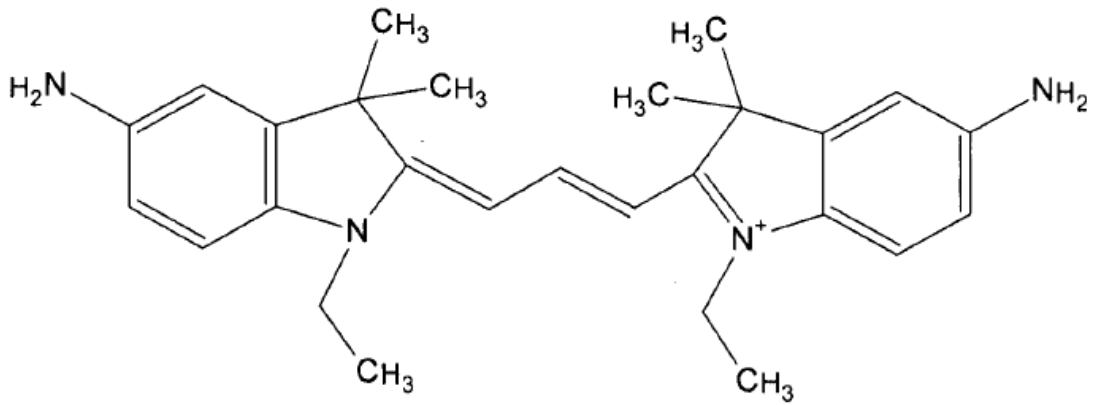
o



15

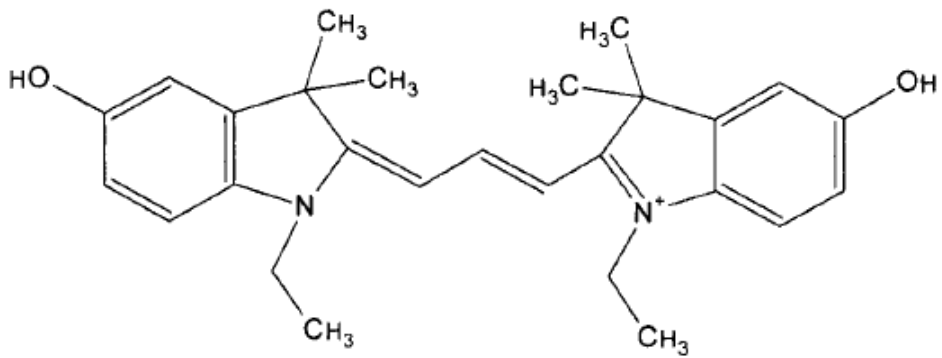
Fórmula IVa.

o



Fórmula IIIb.

o

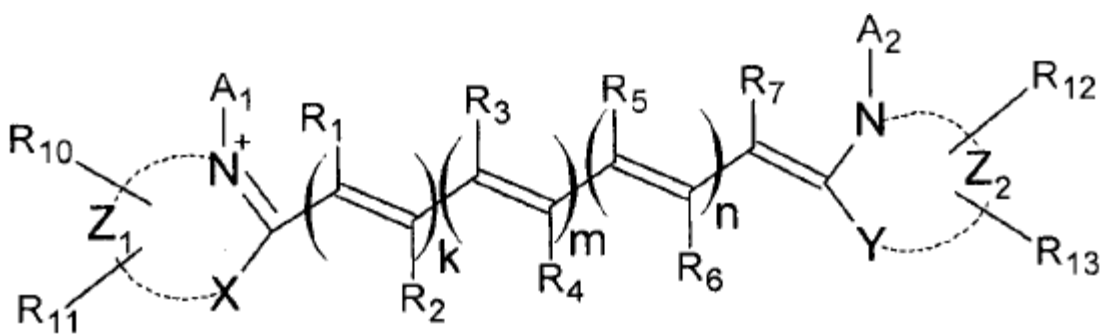


Fórmula VII.

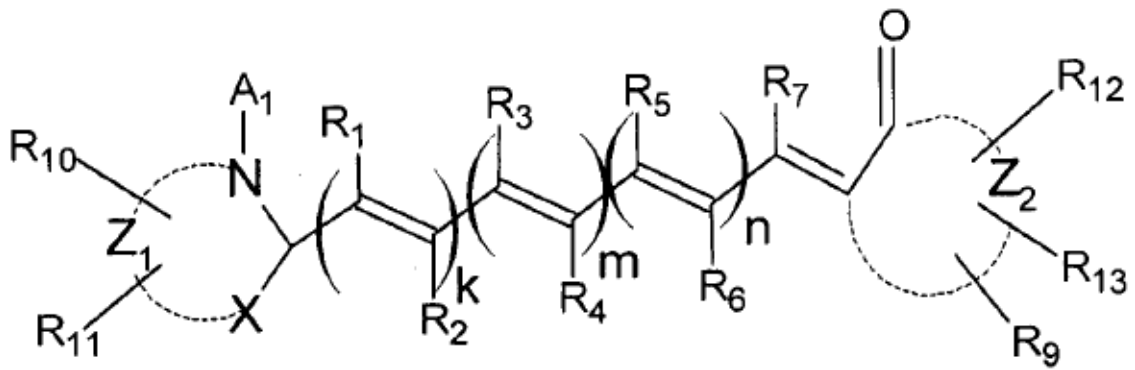
5

e) Un kit que comprende

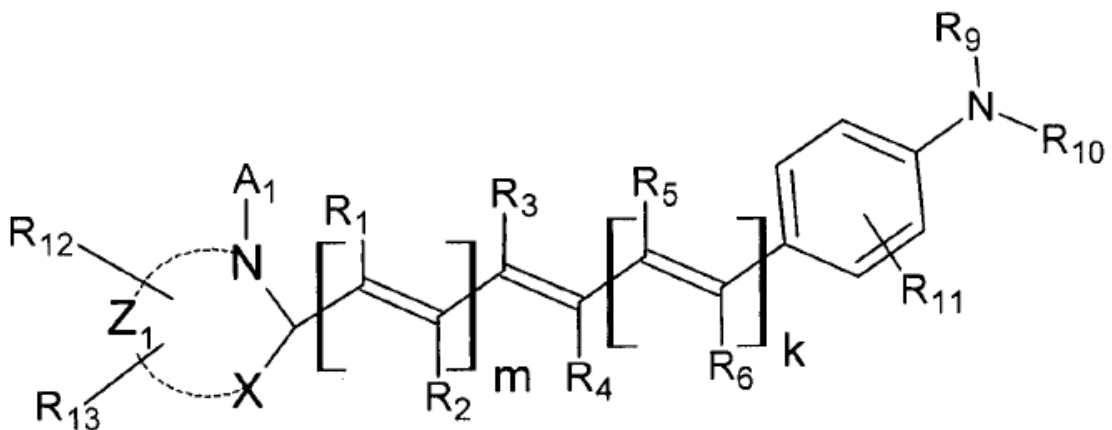
a) al menos un compuesto según la fórmula



Fórmula X.



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

5 en el que en las fórmulas X-XII

- las líneas discontinuas Z_1 y Z_2 representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada del grupo que consiste en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático (-NH₂), o al menos un grupo hidroxilo aromático (-OH), o al menos un grupo fosfato aromático (-PO₄), o una mezcla de los mismos, unidos,

10

- k y m y n son independientemente 1 ó 0,

- R₁ a R₁₃ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -(D)_j y -(B)_i-(D)_j,

- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂- o -CH=CH-, y

- A₁ y A₂ se seleccionan del grupo que consiste en -(D)_j y -(B)_i-(D)_j,

15

- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,

- B es un ligador,

- D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

20

b) instrucciones para su uso como sustrato para al menos una enzima, en el que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

c) opcionalmente al menos una enzima, en el que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

d) opcionalmente al menos un cofactor para la enzima.

25

La invención proporciona además usos de dichos compuestos X-XII como cromógeno, o como fluorocromo, o como ambos.

Además, la presente invención proporciona usos de los compuestos según la invención como sustrato para al menos una enzima. El uso puede ser en realizaciones adicionales en el que la al menos una enzima puede procesar un grupo amina aromático (-NH₂), un grupo hidroxilo aromático (-OH) o un grupo fosfato aromático (-PO₄).

5 Incluso adicionalmente, dichos usos pueden ser en los que la enzima se conjuga con una molécula de unión que puede unirse a al menos una diana de interés.

En todavía incluso realizaciones adicionales, la al menos una enzima es HRP, o AP, o ambas.

En realizaciones adicionales,

10 - las líneas discontinuas Z₁ y Z₂ representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada de los grupos que consisten en un anillo, dos anillos condensados, y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático (-NH₂), o al menos un grupo hidroxilo aromático (-OH), o al menos un grupo fosfato aromático (-PO₄), o una mezcla de los mismos, unidos,

- k y m y n son independientemente 1 ó 0,

-R₁ a R₁₃ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -D y -(B)_i-(D)_j,

15 -X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂ o -CH=CH-, y

- A₁ y A₂ se seleccionan del grupo que consiste en -D y -(B)_i-(D)_j.

Algunas realizaciones son en las que i y j son independientemente cualquier número entre 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6.

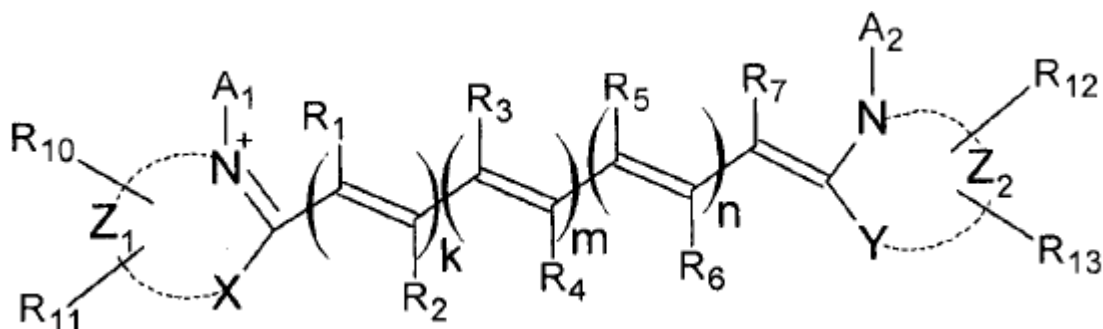
En algunas realizaciones, i es 1.

20 En algunas realizaciones adicionales, j es 1.

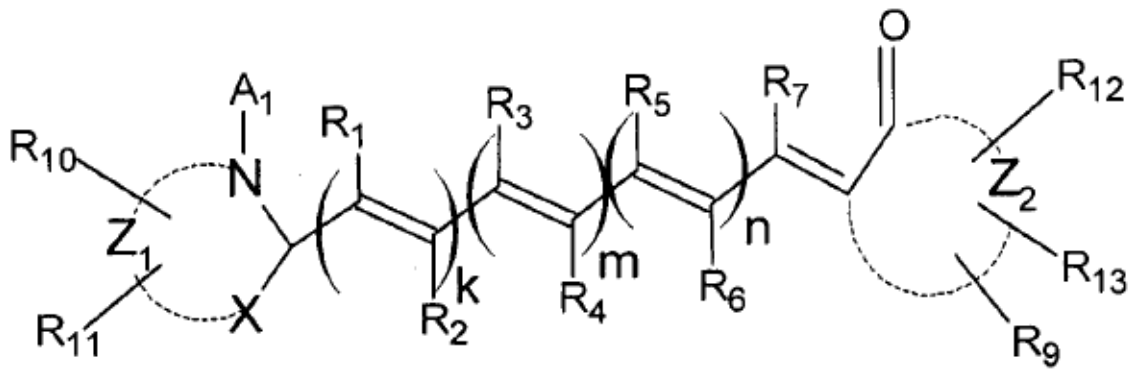
En todavía realizaciones adicionales i es 1 y j es 1.

En realizaciones adicionales, B es un ligador. B puede seleccionar en realizaciones adicionales del grupo que consiste en cadenas de alquilo ramificadas de 1-20 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, cadenas de alquilo lineales de 1-20 átomos de carbono, 25 tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, monoéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, poliéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, y cadenas de polimetina que contienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, o incluso 6 átomos de carbono; y opcionalmente B 30 puede conectar dos de los grupos A₁, A₂ y/o R₁₋₇ formando un sistema de anillos adicional entre dos de A₁, A₂ y R₁₋₇ produciendo de ese modo la parte de cadena de metina central de un sistema de anillos.

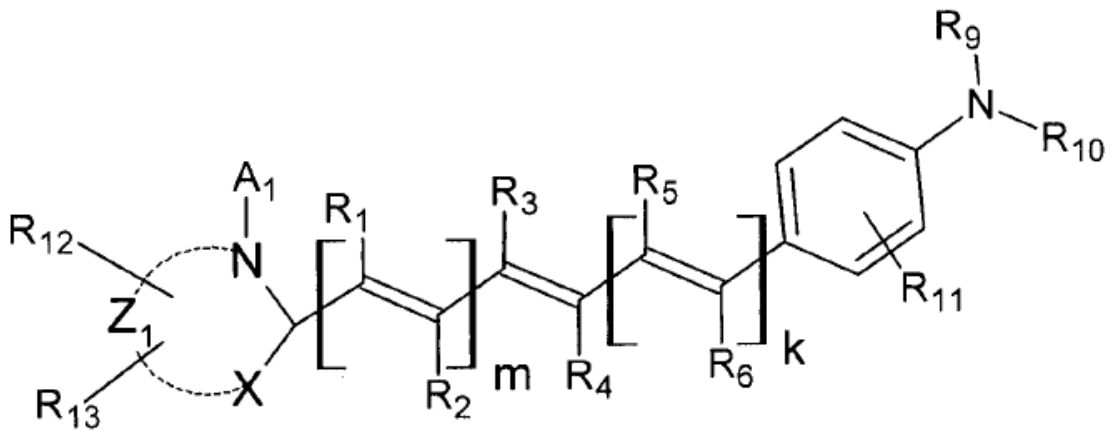
La invención proporciona además un método para precipitar un compuesto según las fórmulas



Fórmula X



Fórmula XI, o



Fórmula XII

- 5 comprendiendo el método las etapas de
- a) proporcionar dicho compuesto según la fórmula X, fórmula XI o fórmula XII,
 - b) proporcionar una enzima,
 - c) poner en contacto el compuesto según la invención con dicha enzima,
 - d) opcionalmente proporcionar un cofactor,

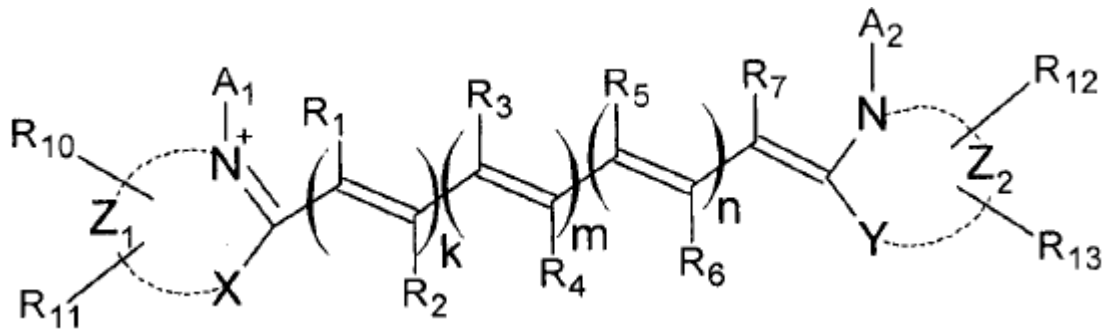
10 en el que dicho compuesto forma un precipitado.

Realizaciones adicionales son en las que el método comprende además la etapa de detectar dicho precipitado.

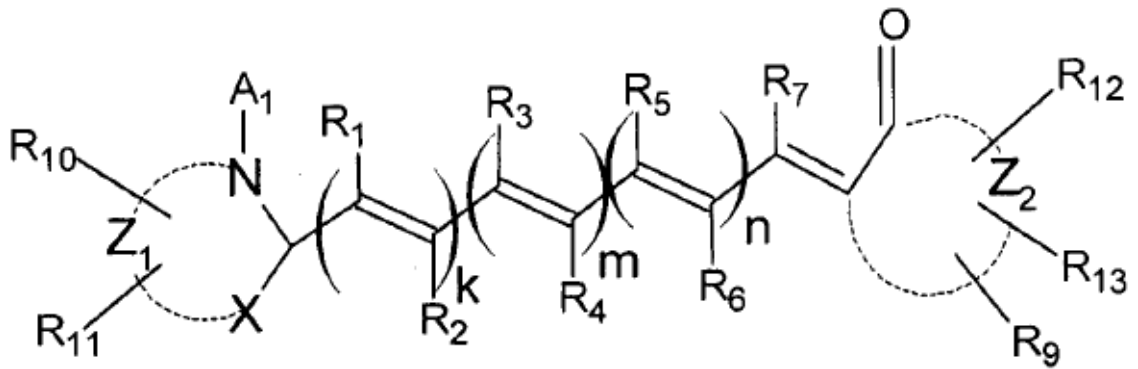
En incluso realizaciones adicionales, el precipitado se detecta mediante microscopía, por ejemplo microscopía óptica o de fluorescencia.

La invención proporciona además un método para detectar una diana, comprendiendo el método las etapas de

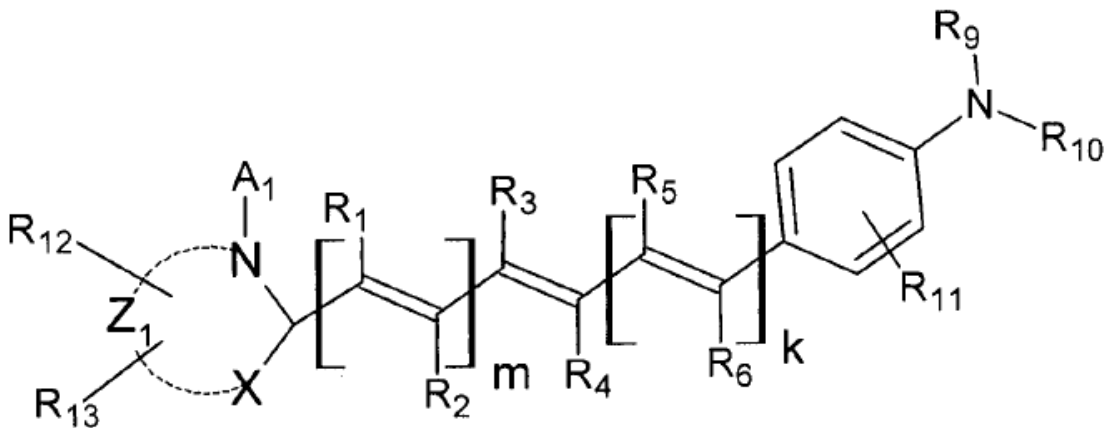
- 15 a) proporcionar dicho al menos un compuesto según la fórmula



Fórmula X,



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

5

- b) proporcionar al menos una enzima,
- c) poner en contacto el compuesto según la invención con dicha enzima,
- d) opcionalmente proporcionar un cofactor, y
- e) detectar dicho precipitado,

10

en el que la detección de dicho precipitado es una detección directa o indirecta de dicha diana.

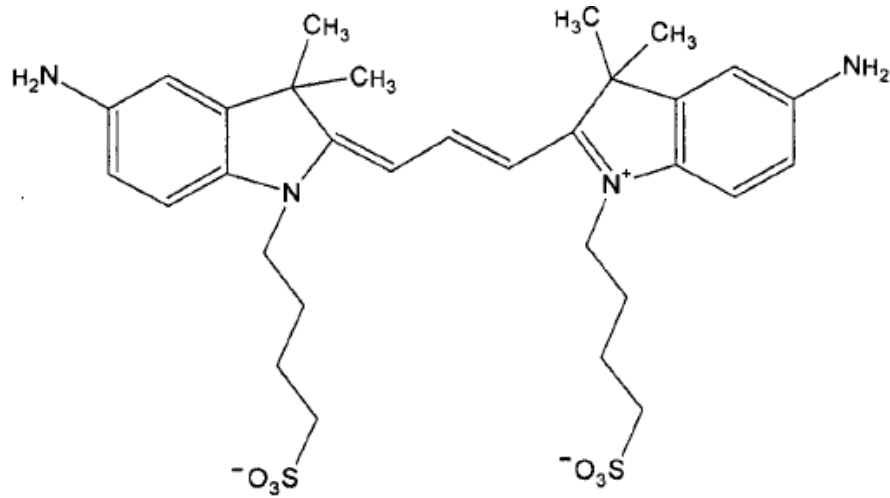
En realizaciones adicionales, el precipitado se detecta mediante microscopía, por ejemplo microscopía óptica, microscopía fluorescente, o ambas.

15

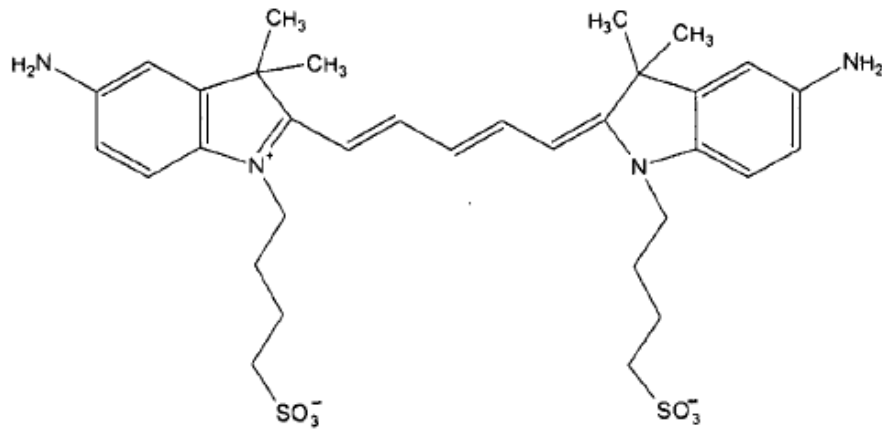
En realizaciones adicionales, los métodos anteriores pueden ser histoquímica, inmunohistoquímica, citoquímica, inmunocitoquímica, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ISH (hibridación *in situ*), FISH (hibridación *in situ* fluorescente), CISH (hibridación *in situ* de cromógenos), citometría de flujo, o cualquier otro método que utilice o bien un compuesto cromogénico, un compuesto fluorescente, o bien ambos. En otra realización,

los métodos anteriores son inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o CISH (hibridación *in situ* de cromógenos).

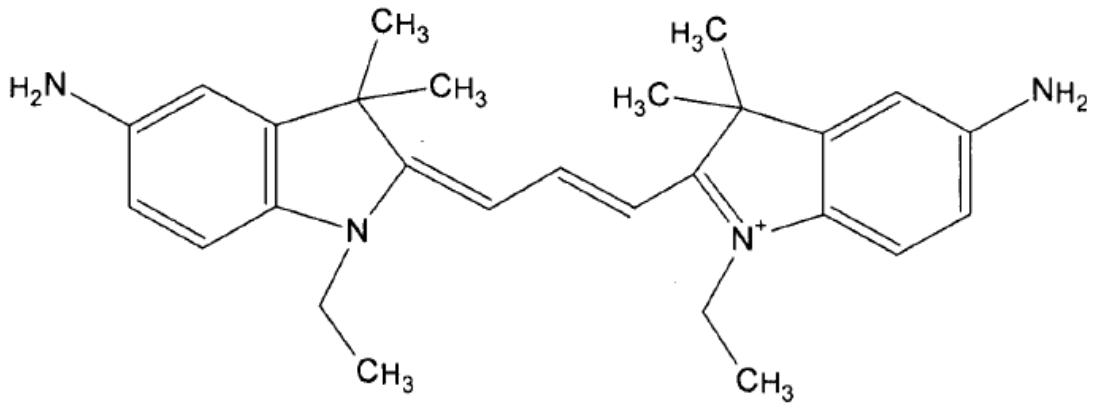
La invención proporciona además un compuesto según la fórmula



Fórmula IIIa,



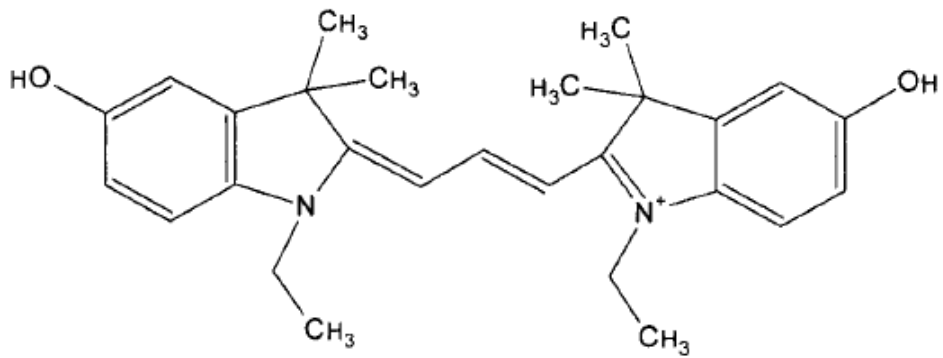
Fórmula IVa,



Fórmula IIIb y

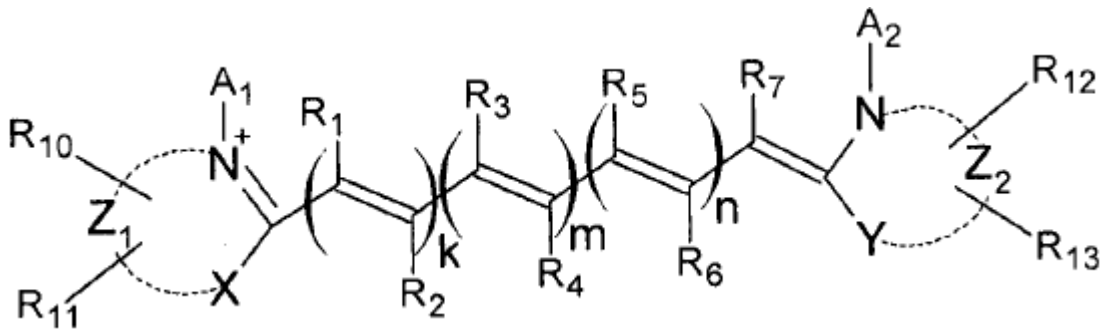
5

o

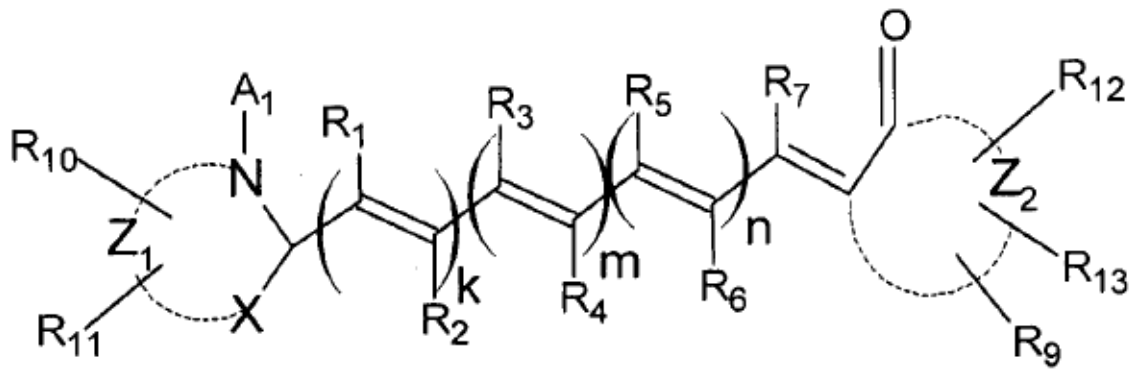


Fórmula VII.

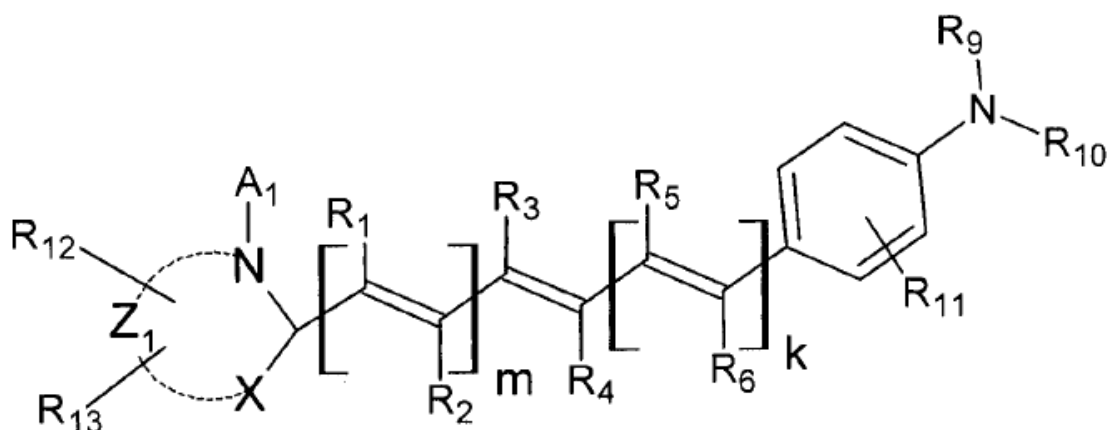
Todavía incluso adicionalmente, la invención da a conocer un kit que comprende a) al menos un compuesto según la fórmula



Fórmula X.



Fórmula XI, o



Fórmula XII

b) instrucciones para su uso como cromógeno, fluorocromo, o ambos,

c) opcionalmente al menos una enzima,

5 d) opcionalmente al menos un cofactor para la enzima.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la fórmula general X de compuestos basados en cianina según la invención.

10 La figura 2 representa la fórmula general XI de compuestos basados en merocianina según la invención.

La figura 3 representa la fórmula general XII de compuestos basados en estirilo según la invención.

La figura 4 representa un compuesto según la invención, compuesto IIIa, que funciona tanto como cromógeno y como fluorocromo.

15 La figura 5 representa un compuesto según la invención, compuesto IVa, que funciona tanto como cromógeno y como fluorocromo.

La figura 6 representa un compuesto según la invención, compuesto IIIb, que funciona tanto como cromógeno y como fluorocromo.

La figura 7 representa un compuesto según la invención, compuesto VII, que funciona tanto como cromógeno y como fluorocromo.

20 La figura 8a-f muestra tejido de colon teñido con anti-citoqueratina y detectado con compuestos de cianina según la invención. Los compuestos se visualizan mediante o bien microscopía óptica o bien microscopía fluorescente. La figura 8a muestra una referencia en la que se usa AEC (3-amino-9-etilcarbazol) como cromógeno, la figura 8b representa el uso del compuesto IIIa como cromógeno y en la que la contratinción es rojo rápido nuclear, la figura 8c representa el uso del compuesto VII como cromógeno y en la que la contratinción es rojo rápido nuclear, la figura 8d representa el uso del compuesto IVa como cromógeno, la figura 8e representa el uso del compuesto IIIb como fluorocromo precipitado y en la que se usa DAPI como contratinción, y la figura 8f representa el uso del compuesto IVa como fluorocromo precipitado y en la que se usa DAPI como contratinción.

25 La figura 9 muestra la síntesis del compuesto VII y un ejemplo de cómo puede convertirse en un sustrato para fosfatasa alcalina. En primer lugar, se somete a reflujo una mezcla de 3-metil-2-butanona y clorhidrato de 4-metoxifenilhidrazina en etanol para dar 5-metoxi-2,3,3-trimetilindolenina (V). La escisión del metoxi éter mediante tratamiento con tribromuro de boro seguido por cuaternización con yoduro de etilo produce yoduro de 1-etil-5-hidroxi-2,3,3-trimetil-3H-indolio (VI). La reacción con ortoformiato de trietilo produce el compuesto de cianina (VII). Este compuesto puede entonces fosforilarse adicionalmente con fosforoxitricloruro seguido por la adición de agua para dar el compuesto bisfosforilado (VIII).

35 La figura 10 muestra un esquema general para la síntesis de una gama de compuestos de cianina, tales como compuesto VII, III y IV. En primer lugar, se nitra el sistema de anillos de partida, entonces se reduce el grupo nitro para dar un grupo amino usando formiato de amonio y paladio sobre carbono. El grupo amino se protege mediante la reacción con dicarbonato de di-terc-butilo. A continuación, se cuaterniza el nitrógeno del anillo mediante reacción

con un yoduro de etilo (R) o butanosultona (R) para dar el compuesto II. La reacción con o bien ortoformiato de trietilo o bien monoclóhidrato de malonaldehído-bis(fenilimina) en ambos casos seguido por tratamiento con ácido trifluoroacético da los compuestos de cianina III o IV. Se muestran alternativas para X y R en la figura como a-e en la tabla en la esquina inferior izquierda de la figura 10 (por debajo de la síntesis general).

- 5 La figura 11 muestra un ejemplo de un procesamiento enzimático secuencial doble de un compuesto. El grupo fosfato se hidroliza en primer lugar por la enzima AP, dejando un grupo hidroxilo disponible y listo para su procesamiento por la enzima HRP.

Descripción detallada

Definiciones

- 10 Tal como se usa en el presente documento el término "cromógeno" pretende significar una sustancia que puede transformarse o procesarse para dar un pigmento. Los cromógenos forman precipitados coloreados cuando se procesan por una enzima. En condiciones normales de uso dichos precipitados están intensamente coloreados cuando se observan usando condiciones de iluminación habituales.

- 15 El término "anillo de átomos de carbono" tal como se usa en el presente documento se refiere a un sistema cíclico de átomos que contiene el número de átomos de carbono mencionado en el texto además de otros átomos tales como átomos de azufre y nitrógeno. Un ejemplo es el sistema de anillos de indol que consiste en 2 anillos condensados, concretamente un anillo de 6 átomos de carbono y un anillo de 4 átomos de carbono. El anillo de 4 átomos de carbono tiene también un átomo de nitrógeno incluido en el anillo.

- 20 El término "grupo funcional" tal como se usa en el presente documento se refiere a un átomo o grupos de átomos específicos que proporcionarán a un compuesto una característica química específica.

El término "color" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier color generado y/o detectable a partir de un cromógeno, por ejemplo un color de cromógeno, un fluorocromo fluorescente, por ejemplo un color de fluorocromo, o un compuesto según la invención.

- 25 El término "cofactor" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que necesita una enzima para procesar otro compuesto (es decir, peróxido de hidrógeno que necesita HRP) o un compuesto que reacciona directamente con un compuesto tras haberlo procesado la enzima (es decir sales de diazonio usadas para sustratos de AP conocidos).

- 30 El término "precipitado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o sustancia que sedimenta de la disolución o se une covalentemente a una molécula. La unión covalente puede ser a otra molécula en disolución, extrayendo de ese modo la sustancia o compuesto de la disolución, o a una molécula del tejido, o a cualquier otra molécula unida a un tejido o una célula, extrayendo de ese modo la sustancia o compuesto de la disolución.

El término "fluorocromo" se refiere a una sustancia o compuesto fluorescente, en el que dicha sustancia o compuesto precipita cuando se procesa por una enzima.

- 35 El término "aromático" pretende significar en el presente documento una molécula o compuesto orgánico en el que los átomos constituyentes, o cualquier parte de los mismos, forman un anillo. El anillo contiene al menos un doble enlace carbono-carbono (-CH=CH-). Por tanto, por ejemplo una amina aromática es una amina en la que el nitrógeno está conectado a un anillo aromático.

Los compuestos

- 40 Tal como se reveló anteriormente la invención da a conocer compuestos que pueden usarse como cromógenos, como fluorocromos, o como ambos, es decir el compuesto tiene ambas características. Ejemplos de grupos de moléculas son compuestos de cianina modificados para el fin, por ejemplo Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, merocianinas y estirilos. Los compuestos según la invención se representan en las fórmulas generales X-XII mostradas en las figuras 1-3.

- 45 Además, los compuestos pueden cambiarse para modificar la absorbancia y emisión para adecuarse a las necesidades específicas del usuario, al tiempo que se mantiene la estructura global de la molécula. Dicho compuesto puede adaptarse entonces a la absorción deseada o emitir la longitud de onda deseada simplemente cambiando los sustituyentes en los sistemas de anillos, o la longitud del puente de metina, o ambos. El compuesto global es todavía el mismo y como consecuencia no es necesaria la optimización de las condiciones de la reacción enzimática.

50 Por tanto, los compuestos según la invención son tanto excelentes fluorocromos como excelentes cromógenos.

La figura 1-3 muestra las fórmulas generales X, XI y XII de compuestos según la invención. La fórmula X se basa en cianina, la fórmula XI se basa en merocianina y la fórmula XII se basa en estirilo.

Por tanto, la invención proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en cianina, merocianina y estirilo según las fórmulas X-XII y en las que

- 5 - las líneas discontinuas Z_1 y Z_2 representan los átomos necesarios para completar la estructura seleccionada del grupo que consiste en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático ($-NH_2$), o al menos un grupo hidroxilo aromático ($-OH$), o al menos un grupo fosfato aromático ($-PO_4$), o una mezcla de los mismos, unidos,
- k y m y n son independientemente 1 ó 0,
- R_1 a R_{13} se seleccionan individualmente del grupo que consiste en $-(D)$ y $-(B)i-(D)j$,
- 10 - X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, $-C(CH_3)_2-$ o $-CH=CH-$,
- A_1 y A_2 se seleccionan del grupo que consiste en $-(D)j$ y $-(B)i-(D)j$.

Algunas realizaciones son en las que i y j son independientemente cualquier número entre 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6.

En alguna realización, i es 1.

- 15 En algunas realizaciones adicionales, j es 1.

En todavía realizaciones adicionales i es 1 y j es 1.

- En realizaciones adicionales B es un ligador. El ligador puede ser de fórmula general $[-B]_n$ y en la que n es un número entero de entre 1-10. El ligador puede seleccionarse del grupo que consiste en cadenas de alquilo ramificadas de 1-20 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, cadenas de alquilo lineales de 1-20 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, monoéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, poliéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, y cadenas de polimetina que contienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, o incluso 6 átomos de carbono; y opcionalmente B puede conectar dos de los grupos A_1 , A_2 y R_{1-7} formando por tanto un sistema de anillos adicional entre dos de A_1 , A_2 y R_{1-7} produciendo la parte de cadena de metina central de un sistema de anillos.
- 20
- 25

En realizaciones adicionales el sistema de anillos adicional anterior es un anillo de 4-6 átomos de carbono, tal como un anillo de 4, 5, o incluso 6 átomos de carbono.

- 30 En realizaciones adicionales el sistema de anillos adicional anterior es un anillo de 6 átomos de carbono.

En realizaciones adicionales D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino.

- El compuesto funcionará como sustrato para una enzima, por ejemplo peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP). El grupo amino y el grupo hidroxilo harán que el compuesto sea susceptible al procesamiento por HRP y el grupo fosfato hará que el compuesto sea susceptible a AP. Por tanto, en realizaciones adicionales, $-OH$, $-NH_2$ y $-PO_4$ son sustratos para enzimas. Ejemplos de enzimas son HRP y AP.
- 35

En una realización el compuesto comprende al menos un grupo amino aromático.

- En realizaciones adicionales el compuesto comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o incluso 10 grupo(s) amino. Realizaciones adicionales comprenden 2-4 grupos amino aromáticos. Una realización específica comprende 4 grupos amino aromáticos.
- 40

En una realización adicional, el compuesto comprende al menos un grupo hidroxilo.

- En realizaciones adicionales el compuesto comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o incluso 10, grupo(s) hidroxilo aromático(s). Realizaciones adicionales comprenden 1-2 grupo(s) hidroxilo aromático(s). Una realización específica comprende 2 grupos hidroxilo aromáticos.
- 45

En todavía una realización adicional, el compuesto comprende al menos un grupo fosfato.

En realizaciones adicionales el compuesto comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o incluso 10 grupo(s) fosfato aromático(s). Realizaciones adicionales comprenden 1-2 grupo(s) fosfato aromático(s). Una realización específica comprende 2 grupos fosfato aromáticos.

En todavía una realización adicional, el compuesto comprende al menos un grupo fosfato aromático y al menos un

grupo amino aromático para permitir el procesamiento por la enzima de elección, o bien mediante procesamiento por HRP, procesamiento por AP o procesamiento por ambas enzimas posteriormente o juntas.

En todavía una realización adicional, un compuesto según la invención comprende al menos un grupo fosfato. El grupo fosfato se hidroliza en primer lugar por la enzima AP, dejando un grupo hidroxilo disponible y listo para su procesamiento por la enzima HRP si así se desea. Esta realización puede crear dos dianas enzimáticas secuenciales y permitir un procesamiento enzimático diferente en un único compuesto, es decir una reacción enzimática doble. Esta reacción enzimática doble puede ser en realizaciones específicas secuenciales. Además no es necesaria una sal de diazonio para localizar el compuesto en esta realización puesto que esto se realizará mediante la etapa de procesamiento por HRP. En esta realización se requiere que ambas dianas enzimáticas estén presentes en la muestra para conseguir la localización del compuesto. En una realización las dianas son por ejemplo proteína 1 y proteína 2. Estas dos proteínas, si están próximas y si tienen afinidad entre sí, pueden formar un heterodímero que comprende una de cada una de las proteínas. Las dos proteínas pueden también estar ubicadas por separado una de otra, sin formar tanto un dímero o heterodímero, pero todavía están lo suficientemente próximas como para que tenga lugar una reacción enzimática doble descrita más adelante con tanto AP como HRP. El tratamiento de una muestra que comprende por ejemplo el heterodímero con un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina contra la proteína 1 y un anticuerpo marcado con HRP contra la proteína 2 puede producir entonces una tinción específica que muestra que el dímero está presente. La visualización se realiza con el uso de sólo un colorante que funcionará secuencialmente como sustrato para las dos enzimas. En primer lugar la AP anti-proteína 1 procesa el sustrato/colorante generando de ese modo un grupo hidroxilo aromático sobre el colorante/sustrato. Entonces la HRP anti-proteína 2 puede procesar el grupo hidroxilo aromático sobre el sustrato/colorante para dar un precipitado detectable. En la figura 11 se observa un ejemplo de una etapa de procesamiento enzimático doble. Tras el contacto con la enzima el colorante se localizará alrededor de la enzima por precipitación, incluyendo unión covalente o localización en moléculas vecinas. Cofactores para la enzima son por ejemplo peróxido de hidrógeno o una sal de diazonio. La sal de diazonio capturará además el compuesto tras la escisión del grupo fosfato. El compuesto forma entonces un precipitado coloreado que es visible mediante microscopía, tanto óptica como de fluorescencia.

La deslocalización de un par de electrones en un anillo de indol a lo largo del sistema de puente insaturado de polimetina define el máximo de absorción que corresponde a la transición desde un estado basal hasta un estado excitado. Por cada aumento de doble enlace en la cadena de metina, habría un desplazamiento batocrómico de 100 nm en contraposición a sólo 20 nm por cada anillo aromático adicional. (Wellington P., Medarova Z., y Moore A., *Synthesis and application of a water soluble near infrared dye for cancer detection using optical imaging*. Bioconjugate Chem., 2005. 16: p. 735-740). Por tanto la longitud de onda de absorción y emisión de los compuestos de cianina puede ajustarse finamente a lo largo de un amplio intervalo de longitudes de onda para dar al precipitado el color deseado. Usando el mismo principio de ajuste fino de la longitud de onda, la absorción de los compuestos basados en merocianina y estirilo puede ajustarse de manera fina a la longitud de onda deseada. Pueden encontrarse ejemplos de cálculos para la longitud de onda en Tyutyulkov, N., *et al.*, *Polymethine dyes: Structure and properties*. 1ª ed. 1991: St. Kliment Ohridski University press. 249. El ajuste fino de los compuestos es de especial importancia en el caso en el que vaya a usarse más de un compuesto en el mismo portaobjetos (tinción múltiple). La absorbancia del compuesto puede ajustarse entonces de manera fina para proporcionar una separación espectral óptima de la absorbancia de la de otros compuestos. Asimismo los colorantes pueden ajustarse de manera fina para lograr un rendimiento óptimo en un escáner con un conjunto de filtro específico.

En realizaciones adicionales, la enzima se conjuga con una molécula de unión que puede unirse a al menos una diana de interés. Esto se describe adicionalmente a continuación.

En una realización adicional, la al menos una enzima es HRP.

En una realización adicional, la al menos una enzima es AP.

En una realización adicional, la al menos una enzima son al menos dos enzimas. Ejemplos de al menos dos enzimas son HRP y AP. En una realización adicional, las al menos dos enzimas se usan en un orden secuencial que es en primer lugar AP, seguido por HRP.

Una realización de un compuesto según la invención es el compuesto IIIa. En el compuesto IIIa, R₁₀ y R₁₂ son un grupo amino y se definen como -D. R₁, R₂, R₇, R₁₁ y R₁₃ son hidrógeno y se definen como -D. Z₁ y Z₂ son 6 átomos que crean dos anillos condensados, concretamente un anillo de 4 carbonos con un átomo de nitrógeno y un anillo de 6 carbonos. El sistema de anillos específico es el sistema de anillos de indol. Además, k = 1; m = 0; y n = 0. Esta realización comprende además X como -C(CH₃)₂ e Y como -C(CH₃)₂-. Incluso adicionalmente, en esta realización A₁ y A₂ son -(B)_i-(D)_j en donde B es una cadena de alquilo lineal de 4 átomos de carbono y D es un sulfonato. En la figura 4 se muestra en el compuesto IIIa. Además, en esta realización, j = 1; i = 1.

Una realización adicional de un compuesto según la invención es el compuesto IVa. En el compuesto IVa, R₁₀ y R₁₂ son un grupo amino y se definen como -D, R₁, R₂, R₃, R₄, R₇, R₁₁ y R₁₃ son hidrógeno y se definen como -D. Z₁ y Z₂ son 6 átomos que crean dos anillos condensados, concretamente un anillo de 4 carbonos con un átomo de nitrógeno y un anillo de 6 carbonos. Este sistema de anillos específico es el sistema de anillos de indol. Además, k = 1; m = 1; n = 0. Esta realización comprende además X como -C(CH₃)₂- e Y como -C(CH₃)₂-. Incluso adicionalmente en esta

realización, A_1 y A_2 son $-(B)_i-(D)_j$ en donde B es una cadena de alquilo lineal de 4 átomos de carbono y D es un sulfonato. En la figura 5 se muestra el compuesto IVa. Además, en esta realización $j = 1$; $e = 1$.

5 Una realización adicional de un compuesto según la invención es el compuesto IIIb. En el compuesto IIIb, R_{10} y R_{12} son un grupo amino y se definen como -D, R_1 , R_2 , R_7 , R_{11} y R_{13} son hidrógeno y se definen como -D. Z_1 y Z_2 son 6 átomos que crean dos anillos condensados, concretamente un anillo de 4 carbonos con un átomo de nitrógeno y un anillo de 6 carbonos. Este sistema de anillos específico es el sistema de anillos de indol. Además, $k = 1$; $m = 0$; $n = 0$. Esta realización comprende además X como $-C(CH_3)_2-$ e Y como $-C(CH_3)_2-$. Incluso adicionalmente en esta realización A_1 y A_2 son $-(B)_i-(D)_j$ en donde B es una cadena de alquilo lineal de 2 átomos de carbono y D es hidrógeno. En la figura 6 se muestra el compuesto IIIb. Además, en esta realización, $j = 1$; $e = 1$.

10 Una realización adicional de un compuesto según la invención es el compuesto VII. En el compuesto VII, R_{10} y R_{12} son un grupo hidroxilo y se definen como -D, R_1 , R_2 , R_7 , R_{11} y R_{13} son hidrógeno y se definen como -D. Z_1 y Z_2 son 6 átomos que crean dos anillos condensados, concretamente un anillo de 4 carbonos con un átomo de nitrógeno y un anillo de 6 carbonos. Este sistema de anillos específico es el sistema de anillos de indol. Además, $k = 1$; $m = 0$; $n = 0$. Esta realización comprende además, X como $-C(CH_3)_2-$ e Y como $-C(CH_3)_2-$. Incluso adicionalmente en esta
15 realización, A_1 y A_2 son $(B)_i-(D)_j$ en donde B es una cadena de alquilo lineal de 2 átomos de carbono y D es hidrógeno. En la figura 7 se muestra el compuesto VII. Además, en esta realización, $j = 1$; $e = 1$.

Uso de compuestos según la invención como cromógenos

20 La invención da a conocer además varios usos de un compuesto según la invención tal como se describió y ejemplificó anteriormente, seleccionado del grupo que consiste en cianina, merocianina y estirilo según las fórmulas generales X-XII mostradas en las figuras 1-3, respectivamente.

El compuesto según la invención tiene la capacidad de funcionar como colorante cromógeno. La invención da a conocer por tanto el uso de un compuesto según la invención como cromógeno.

El compuesto según la invención tiene además la capacidad de funcionar como fluorocromo. La invención da a conocer por tanto el uso de un compuesto según la invención como fluorocromo.

25 En una realización adicional el compuesto según la invención funciona tanto como cromógeno y como fluorocromo. Puesto que el compuesto según la invención tiene la capacidad de funcionar tanto como fluorocromo y como cromógeno, dependerá del usuario final que propiedades usar, dependiendo de las condiciones del ensayo en cada caso. Esto proporcionará una libertad máxima y posibilidades de optimización cuando se diseña un ensayo.

30 El compuesto según la invención tiene la capacidad de funcionar como sustrato para una enzima. Tras el contacto con la enzima el compuesto se fijará alrededor de la enzima mediante precipitación, lo que significa que el compuesto se sedimenta de la disolución o se une covalentemente a una molécula. La unión covalente puede ser a otra molécula en disolución, extrayendo de ese modo la sustancia y el compuesto de la disolución. Esto puede ser una reacción separada entre un cofactor o cualquier otra molécula y el compuesto procesado por la enzima, es decir no se requiere ninguna enzima para esta reacción. Alternativamente, la unión covalente puede ser a una molécula
35 del tejido, o a cualquier otra molécula unida a un tejido o una célula, extrayendo de ese modo la sustancia o el compuesto de la disolución.

En realizaciones adicionales, la al menos una enzima puede procesar un grupo amina aromático ($-NH_2$), un grupo hidroxilo aromático ($-OH$) o un grupo fosfato aromático ($-PO_4$).

40 El compuesto, tras el contacto con la enzima tal como se describió anteriormente, formará de ese modo un precipitado coloreado que es visible mediante microscopía, en este caso microscopía óptica cuando se usa como cromógeno según procedimientos conocidos y disponibles de microscopía óptica cuando se analiza un colorante cromogénico. Sin embargo, el compuesto es visible como fluorocromo así como mediante visualización en un microscopio de fluorescencia, según procedimientos conocidos y disponibles de microscopía de fluorescencia.

45 El uso anterior del compuesto puede ser por ejemplo en histoquímica, inmunohistoquímica, citoquímica, inmunocitoquímica, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ISH (hibridación *in situ*) o FISH (hibridación *in situ* fluorescente) o CISH (hibridación *in situ* de cromógenos), y por ejemplo citometría de flujo, o en cualquier otro método que utilice o bien color(es) fluorescente(s) o bien color(es) cromogénico(s), o ambos. Tales métodos se conocen y se describen en la técnica en por ejemplo Johnstone AP, Tumer MW eds *Immunohistochemistry 2. A practical approach*, Oxford university press 1997, págs. 71-130; R.A. DeLellis, *Advances in Immunohistochemistry*, Raven Press, N.Y., 1988, ISBN 0-88167-394-3; J.C. Jennette, *Immunology in diagnostic pathology*, CRC Press, 1989, U.S., ISBN 25 0-8493-4987-7; T.Boenisch, *Handbook in Immunological Staining Methods* (DakoCytomation A/S, 2001, CA); Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, (1989); Crowther, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, en *Molecular Biomethods Handbook*; Rapley et al. [eds.], págs. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N.J. [1998]; Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press [1988]; Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 11, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York [1994]; Jaroszeski et al, *Method in Molecular Biology*, (1998), vol. 9 1: Flow Cytometry Protocols, Hummama Press; Longobanti Givan, (1992) *Flow Cytometry*, First Principles, Wiley Liss. En la sección de
55

ejemplo se encuentran ejemplos adicionales de protocolos adecuados para los compuestos según la invención.

Tal como se mencionó anteriormente el compuesto tiene además la capacidad de funcionar como sustrato para una enzima. El procesamiento de un colorante o compuesto cromogénico por una enzima para formar un precipitado coloreado se conoce en la técnica y puede aplicarse completamente en este sistema. Ejemplos de enzimas que tendrán la capacidad de procesar compuestos según la invención son peroxidasa del rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP) o cualquier otra enzima que utilice -OH, -NH₂ o PO₄ como sustrato (Kemeny, D.M.1997. Enzyme-linked immunoassays. En *Immunochemistry 1-A Practical Approach*. Johnstone, A.P. y Turner, M. W. (Eds) IRL Press. págs. 147-175).

La mayoría de las enzimas requieren cofactores para funcionar. Ejemplos de cofactores para algunas de las enzimas mencionadas anteriormente son peróxido de hidrógeno. La peroxidasa del rábano cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno. Esta reacción puede acoplarse a la oxidación de un compuesto cromogénico tal como los compuestos según la invención.

La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la escisión de fosfato inorgánico de manera no específica a partir de una amplia variedad de ésteres de fosfato.

Se requiere la presencia de una sal de diazonio para que la AP reaccione con el grupo hidroxilo tras la escisión del fosfato. Alternativamente el sustrato procesado por la AP, es decir los compuestos según la invención, pueden precipitarse mediante procesamiento adicional por HRP.

Los compuestos según la invención pueden ser sustratos para HRP, AP, o ambas. Compuestos que comprenden un grupo amino aromático (-NH₂) o grupo hidroxilo aromático (-OH) pueden funcionar como sustrato para HRP. Compuestos que comprenden un grupo fosfato aromático (-PO₄) pueden funcionar como sustrato para AP.

En una realización el compuesto según la invención es un sustrato para tanto HRP como AP. En dicha realización AP puede procesar dicho compuesto según la invención que comprende un grupo fosfato aromático (-PO₄). El procesamiento por AP puede ir seguido entonces por un procesamiento del compuesto por HRP, ya que el procesamiento por AP puede generar un grupo hidroxilo aromático (-OH) tras el procesamiento de (-PO₄).

Usos adicionales del compuesto según la invención tal como se mencionó anteriormente son como un fluorocromo. El compuesto según la invención tiene la capacidad de funcionar como un fluorocromo. Un fluorocromo es fluorescente cuando se excita apropiadamente. Un fluorocromo fluorecerá, es decir producirá o presentará fluorescencia, cuando se irradia con luz de la longitud de onda apropiada.

En todavía una realización adicional, el compuesto es un fluorocromo que precipita, es decir tiene la capacidad de formar un sólido que sedimenta de la disolución.

En incluso realizaciones adicionales, el fluorocromo que precipita es también un cromógeno. Por tanto, el compuesto puede diseñarse para adecuarse a las necesidades específicas del usuario simplemente cambiando los sustituyentes en el sistema de anillos, ajustando y variando la longitud de la cadena de polimetina, o mediante la elección de A₁ y A₂. Se facilitaron anteriormente ejemplos de sustituyentes.

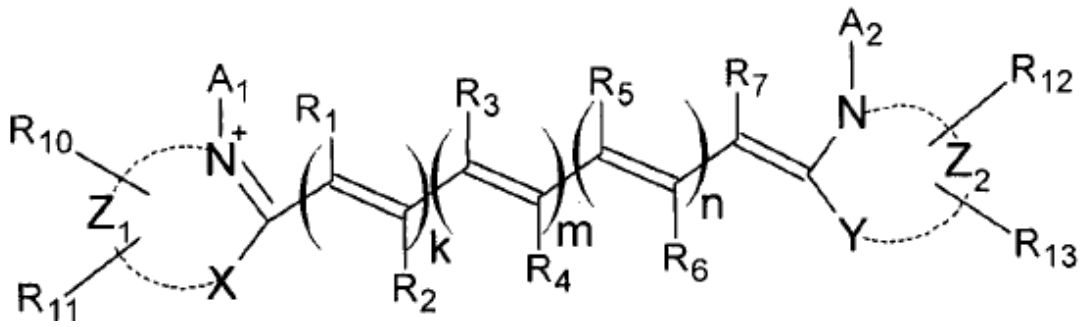
Por tanto, los compuestos que precipitan según la invención son tanto excelentes fluorocromos como excelentes cromógenos. Esta doble capacidad se ejemplifica adicionalmente a continuación.

Métodos para precipitar el compuesto

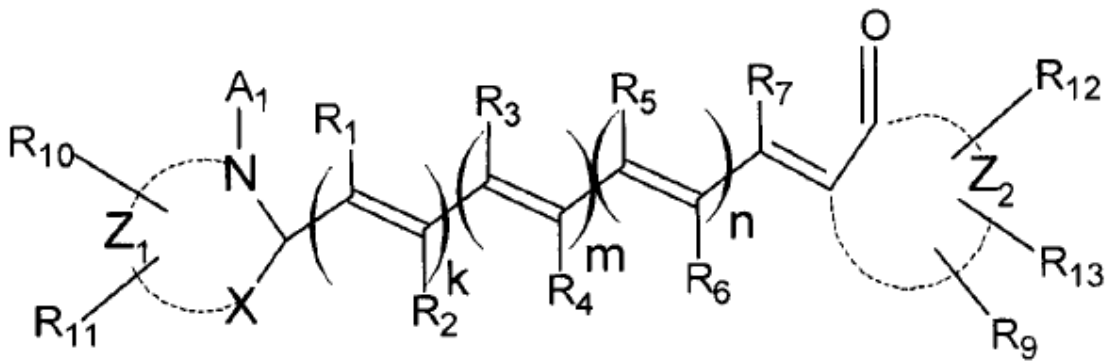
Se dan a conocer en el presente documento métodos para precipitar un compuesto según la invención, por ejemplo un compuesto según las fórmulas X-XII mostradas en las figuras 1-3. Tal como se mencionó anteriormente, el procesamiento de un cromógeno se conoce bien en la técnica. Los compuestos según la invención pueden procesarse con o bien HRP, AP o bien ambas, dependiendo de los grupos sustituyentes en los anillos aromáticos.

El método comprende las etapas de

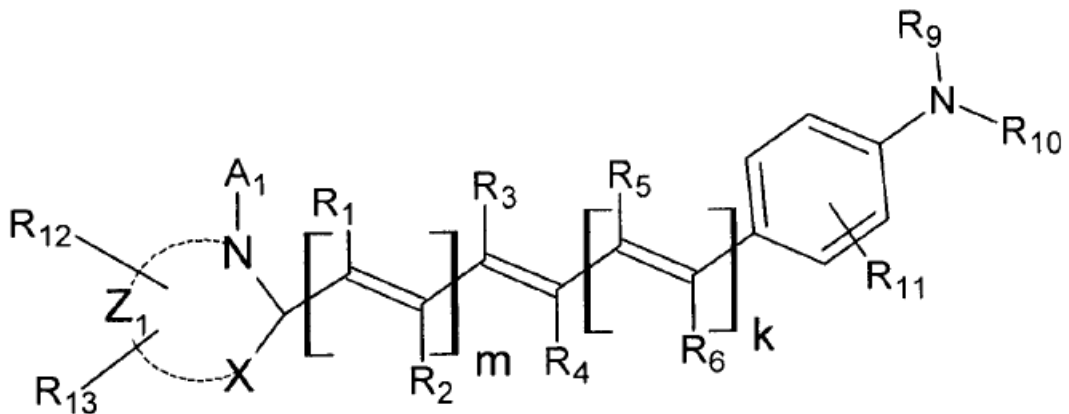
a) proporcionar dicho compuesto según la fórmula



Fórmula X,



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

5

- b) proporcionar una enzima,
- c) poner en contacto el compuesto según la invención con dicha enzima,
- d) opcionalmente proporcionar un cofactor,

10 en el que dicho compuesto forma un precipitado.

En realizaciones adicionales del método, la enzima puede procesar un grupo amina aromático (-NH₂), un grupo hidroxilo aromático (-OH) o un grupo fosfato aromático (-PO₄).

Realizaciones adicionales son en las que la enzima se conjuga con una molécula de unión que puede unirse a al menos una diana de interés.

15 Realizaciones adicionales son en las que el compuesto se proporciona como una disolución en agua o en N-

metilpirrolidona (NMP). En realizaciones adicionales, el compuesto puede proporcionarse en una disolución madre que va a diluirse con el uso, en por ejemplo un tampón, para lograr un tampón de dilución listo para usar de los compuestos (por ejemplo un kit de 2 componentes).

5 En realizaciones adicionales el compuesto comprende al menos un grupo amina aromático, grupo hidroxilo aromático o grupo fosfato aromático. Además realizaciones de los compuestos son en las que

- las líneas discontinuas Z_1 y Z_2 representan los átomos necesarios para completar la estructura seleccionada de un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático, al menos un grupo hidroxilo aromático, al menos un grupo fosfato aromático, o una mezcla de los mismos, unidos,

10 - k y m y n son independientemente 1 ó 0,

- R_1 a R_{13} se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -D y -(B)_i-(D)_j,

- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂- o -CH=CH-,

- A_1 y A_2 se seleccionan del grupo que consiste en -D y (B)_i-(D)_j.

15 Cuando el compuesto se fija a o alrededor de la enzima tras el contacto, formará un precipitado o se unirá covalentemente a una molécula, formando de ese modo un precipitado. La unión covalente puede ser a otra molécula en disolución, extrayendo de ese modo la sustancia y el compuesto de la disolución, o a una molécula de tejido, o a cualquier otra molécula unida a un tejido o una célula, extrayendo de ese modo la sustancia o el compuesto de la disolución.

20 Algunas realizaciones son en las que i y j son independientemente cualquier número entre 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6.

En algunas realizaciones, i es 1.

En algunas realizaciones adicionales, j es 1.

En todavía una realización adicional i es 1 y j es 1.

En realizaciones adicionales B es un ligador.

25 En realizaciones adicionales, B es de fórmula general -[B]_i, y en la que o es un número entero de entre 1-10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o incluso 10. En una realización, o es 1-3. En otra realización, o es 1.

30 En realizaciones adicionales, B se selecciona del grupo que consiste en cadenas de alquilo ramificadas de 1-20 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, cadenas de alquilo lineales de 1-20 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, monoéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, poliéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, y cadenas de polimetina que contienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, o incluso 6 átomos de carbono; opcionalmente B puede conectar dos de los grupos A_1 , A_2 y R_{1-7} formando por tanto un sistema de anillos adicional entre dos de A_1 , A_2 y R_{1-7} produciendo la parte de cadena de metina central de un sistema de anillos.

En realizaciones adicionales el sistema de anillos adicional anterior son anillos de 4-6 átomos de carbono, tales como un anillo de 4, 5, o incluso a 6 átomos de carbono.

En realizaciones adicionales el sistema de anillos adicional anterior son anillos de 6 átomos de carbono.

40 En realizaciones adicionales, D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de fosfato, hidroxilo y amino.

En realizaciones adicionales, dicha enzima es HRP o AP.

Realizaciones adicionales son en las que el compuesto es el compuesto según IIIa en la figura 4, el compuesto según IVa en la figura 5, el compuesto según IIIb en la figura 6 o el compuesto según VII en la figura 7.

45 El compuesto forma por tanto un precipitado coloreado. El precipitado se forma en, alrededor o cerca de la enzima tal como se mencionó anteriormente.

En realizaciones adicionales, el método comprende además detectar el precipitado.

En realizaciones adicionales, el precipitado se detecta mediante visualización por microscopía, por ejemplo

microscopía óptica, microscopía de fluorescencia o ambas según procedimientos conocidos en la técnica.

La detección puede ser manual o en un método automatizado, por ejemplo un método de exploración automatizado. Incluso realizaciones adicionales son en las que la microscopía es mediante un procedimiento automatizado, por ejemplo mediante un procedimiento de exploración automático. Ejemplos de tales sistemas son las plataformas de tecnología ACIS® (Clariant, EE.UU.) Se facilitan ejemplos adicionales de métodos de exploración automatizados así como procesamiento de muestras automatizado en la patente estadounidense n.º 6352861, patente estadounidense n.º 5839091, patente estadounidense n.º 6.183.693, patente estadounidense n.º 5.948.359, patente estadounidense n.º 5.839.091, los documentos WO04059441A2, WO04059297A1, WO04059288A2, WO04059287A2, WO04059284A2, WO04058950A1, WO04058404A2, WO04057308A1, WO04057307A1.

5 En una realización el método automatizado comprende un método de procesamiento de muestras automatizado que puede comprender una o más etapas de:

- establecer un sistema de procesamiento de muestras automatizado que tiene una capacidad de funcionamiento de procesamiento automatizado que provoca acontecimientos de funcionamiento de procesamiento automatizado a través de funciones de procesamiento de muestras robóticas;

15 - cargar una pluralidad de soportes con muestras biológicas en el sistema de procesamiento de muestras automatizado;

- cargar o acceder a datos que permiten que el sistema de procesamiento de muestras defina al menos un protocolo para el control del procesamiento de muestras de cada una de las muestras cargadas; y

20 - opcionalmente realizar el procesamiento de muestras usando al menos un elemento vibrador para mejorar el procesamiento en al menos una etapa de procesamiento.

Una realización adicional de un método de procesamiento de muestras automatizado puede comprender una o más etapas de:

25 - establecer un sistema de procesamiento de muestras automatizado que tiene una capacidad de funcionamiento de procesamiento automatizado que provoca acontecimientos de funcionamiento de procesamiento automatizado a través de funciones de procesamiento de muestras robóticas;

- cargar una pluralidad de soportes con muestras biológicas en el sistema de procesamiento de muestras automatizado;

- cargar o acceder a datos que permiten que el sistema de procesamiento de muestras defina al menos un protocolo para el control del procesamiento de muestras de cada una de las muestras cargadas; y

30 - realizar el procesamiento de muestras usando al menos un elemento de "percusión o golpeteo" para mejorar el procesamiento en al menos una etapa de procesamiento.

Realizaciones adicionales pueden referirse a por ejemplo sistemas de control automatizados para el procesamiento de muestras y también pueden referirse a la adquisición, introducción, mantenimiento y recuperación de datos para el procesamiento de muestras, así como a compartir información del protocolo de procesamiento e información de procesamiento, y capacidades en tiempo real o adaptativas para el procesamiento.

35 Las realizaciones todavía incluso adicionales incluyen en las que los sistemas y métodos pueden comprender opcionalmente un sistema de procesamiento de muestras automatizado que comprende una pluralidad de cajones, una pluralidad de elementos de soporte de muestras que pueden estar incluso configurados de manera retirable cada uno con uno de los cajones, y un sistema de control del procesamiento de muestras adaptativo u otro. Los cajones y los soportes de muestras pueden ser tanto móviles como retirables. El sistema de control de procesamiento de muestras puede automatizar el sistema de procesamiento de muestras de manera que una o más muestras pueden procesarse según uno o más protocolos, indicarse posiblemente mediante información sobre portaobjetos o introducirse de otra forma en el sistema. Este procesamiento de muestras puede comprender uno o más protocolos y etapas de toma de muestras, tales como desparafinización, recuperación de la diana y tinción.

45 Además, puede proporcionarse un sensor, en algunas realizaciones que puede identificar automáticamente información de una o más muestras, soportes de muestras o portaobjetos. En realizaciones, puede proporcionarse información del protocolo o hacerse disponible mediante el sistema de control del procesamiento de muestras. El sistema de procesamiento de muestras puede procesar entonces una o más muestras o quizá portaobjetos, o uno o más lotes de portaobjetos, de manera simultánea, secuencial o de cualquier otro modo temporal, posiblemente según la información del protocolo proporcionada previamente para una muestra por un usuario u otra persona que toma la decisión. Esta información puede entonces hacerse disponible para su uso por el sistema de control del procesamiento de muestras. Incluso pueden insertarse o retirarse lotes de muestras o portaobjetos individuales durante las etapas del protocolo de procesamiento mediante el control y la monitorización logrados por el sistema de control del procesamiento de muestras adaptativo.

Métodos para detectar una diana

La invención comprende además un método para detectar una diana. El método comprende las etapas de proporcionar al menos un compuesto según las fórmulas X-XII según la invención, proporcionar al menos una enzima, poner en contacto el compuesto según la invención con la enzima, opcionalmente proporcionar un cofactor, en el que el compuesto se fijará en, alrededor o próximo a la enzima tras el contacto mediante precipitación formando de ese modo un precipitado, detectar dicho precipitado mediante o bien luz visible o bien fluorescencia, en el que la detección de dicho precipitado es una detección directa o indirecta de dicha diana.

5

En realizaciones adicionales la enzima se conjuga con una molécula de unión que se une directa o indirectamente a una diana de interés.

10 En realizaciones adicionales, la enzima puede procesar un grupo amina aromático (-NH₂), un grupo hidroxilo aromático (-OH), o un grupo fosfato aromático (-PO₄).

En realizaciones adicionales, el precipitado se detecta mediante microscopía, por ejemplo microscopía óptica o microscopía de fluorescencia. Ambas técnicas se conocen en la técnica.

Ejemplos de dianas son cualquier diana biológica o no biológica.

15 Dianas biológicas se refiere a cualquier partícula biológica definida y no definida, tal como, pero sin limitarse a, complejos macromoleculares, incluyendo virus, células, tejidos y combinaciones, que se producen como resultado de reacciones biológicas en células.

Dianas no biológicas se refiere a moléculas o estructuras que se producen fuera de las células como resultado de actividad o bien humana o bien no humana.

20 Ejemplos no limitativos de dianas biológicas son células, proteínas, péptidos, citocinas, anticuerpos, enzimas, hormonas, linfocinas, lípidos, fosfolípidos, receptores, antígenos, haptenos, lectinas, toxinas, hidratos de carbono, oligosacáridos, polisacáridos, ácidos nucleicos, ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), PNA (ácido nucleico peptídico), ácido desoxirribonucleico derivatizado, ácidos nucleicos derivatizados, ácidos ribonucleicos derivatizados, PNA derivatizado, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN, fragmentos de PNA, partículas de virus, componentes de virus, levaduras, componentes de levaduras, bacterias, componentes de bacterias, células sanguíneas, componentes de células sanguíneas, células biológicas, etc.

25

Ejemplos no limitativos de dianas no biológicas son fármacos, componentes sanguíneos no celulares, venenos, polímeros, partículas de polímero, partículas de vidrio, superficies de vidrio, superficies de plástico, partículas de plástico, membranas de polímero y metales.

30 Ejemplos no limitativos adicionales de dianas son dianas definidas químicamente y dianas no definidas químicamente. "Dianas definidas químicamente" se refiere a las dianas con naturaleza y/o composición química conocidas; "dianas no definidas químicamente" se refiere a dianas que tienen una naturaleza/composición química o bien desconocida o bien parcialmente conocida.

35 Ejemplos no limitativos de partículas de unión que se unen a dianas son por ejemplo proteína, péptidos, anticuerpos incluyendo partes y fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos, ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), PNA (ácido nucleico peptídico), ácido desoxirribonucleico derivatizado, ácidos nucleicos derivatizados, PNA derivatizado, ácidos ribonucleicos derivatizados, fragmentos de ADN, fragmentos de ARN, así como fragmentos de PNA.

Síntesis de los compuestos según la invención

40 La presente invención proporciona además la síntesis de compuestos según la invención.

La figura 9 muestra la síntesis del compuesto VII y un ejemplo de cómo puede convertirse en un sustrato para fosfatasa alcalina (AP). En primer lugar, se somete a reflujo una mezcla de 3-metil-2-butanona y clorhidrato de 4-metoxifenilhidrazina para dar 5-metoxi-2,3,3-trimetilindolenina (V). La escisión del metoxiéter mediante tratamiento con tribromuro de boro seguido por cuaternización con yoduro de etilo produce yoduro de 1-etil-5-hidroxi-2,3,3-trimetil-3H-indolio (VI). La reacción con ortoformiato de trietilo produce el compuesto de cianina (VII). Este compuesto puede fosforilarse adicionalmente con oxicloruro de fósforo seguido por hidrólisis con agua para dar el compuesto bis-fosforilado (VIII).

45

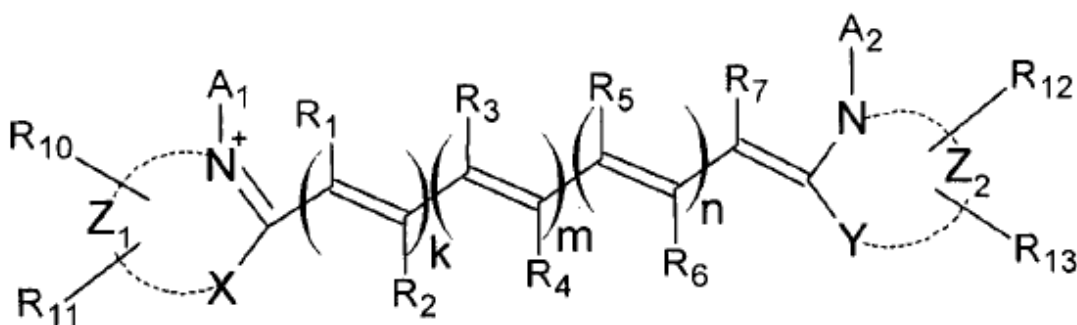
La figura 10 muestra un esquema general para la síntesis de una gama de compuestos de cianina. En primer lugar, se nitra el sistema de anillos de partida, entonces se reduce el grupo nitro para dar un grupo amino usando formiato de amonio y paladio sobre carbono. El grupo amino se protege mediante la reacción con dicarbonato de di-terc-butilo. A continuación, se cuaterniza el nitrógeno del anillo mediante reacción con un yoduro de etilo (R) o butanosulfona (R) para dar el compuesto II. La reacción con o bien ortoformiato de trietilo o bien monoclorhidrato de malonaldehído-bis(fenilimina) en ambos casos seguido por tratamiento con ácido trifluoroacético proporciona los compuestos de cianina III o IV.

50

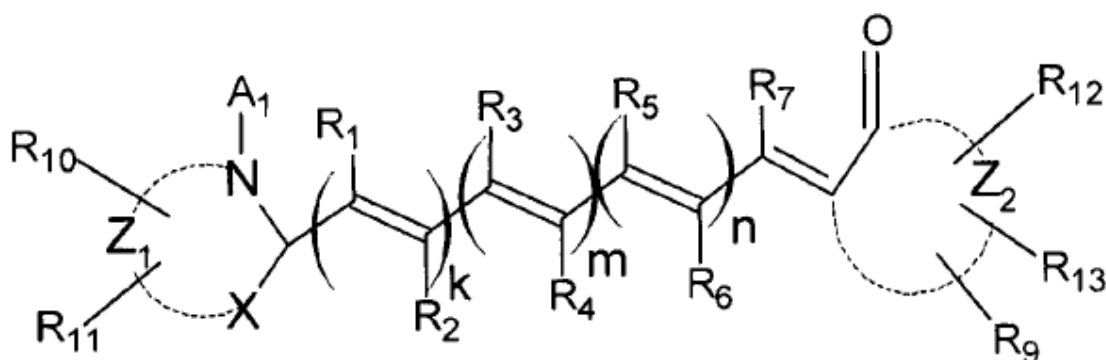
En las figuras 9 y 10 se proporciona una visión general de la síntesis. Los métodos usados se describen en Mujumdar, R. B., *et al.* (*Cyanine dye labeling reagents containing isotiocyanate groups*. *Cytometry*, 1989. 10(1): págs. 11-19) y en Noland, W.E., L.R. Smith, y K.R. Rush (*Nitration of indoles III Polynitration of 2-alkylindoles*. *Journal of the American Chemical Society*, 15 1965. 30: págs. 3457-3469) excepto por algunas excepciones facilitadas en el ejemplo 1 más adelante. Los compuestos V y VI se preparan según Shragina L (*Liquid Crystals*, 1990, vol. 7, n.º 5, págs. 643-655) experto por la cuaternización del nitrógeno en VI en donde se usó yoduro de etilo en lugar de yoduro de metilo. Pueden encontrarse guías generales para la síntesis de los compuestos representados en la fórmula X, fórmula XI y fórmula XII en Tyutyulkov, N., *et al.*, *Polymetine dyes: Structure and properties*. 1ª ed. 1991: St. Kliment Ohridski University press. 249. y en las patentes estadounidenses 5486616 y US 6686145 B1.

5 *Un kit*

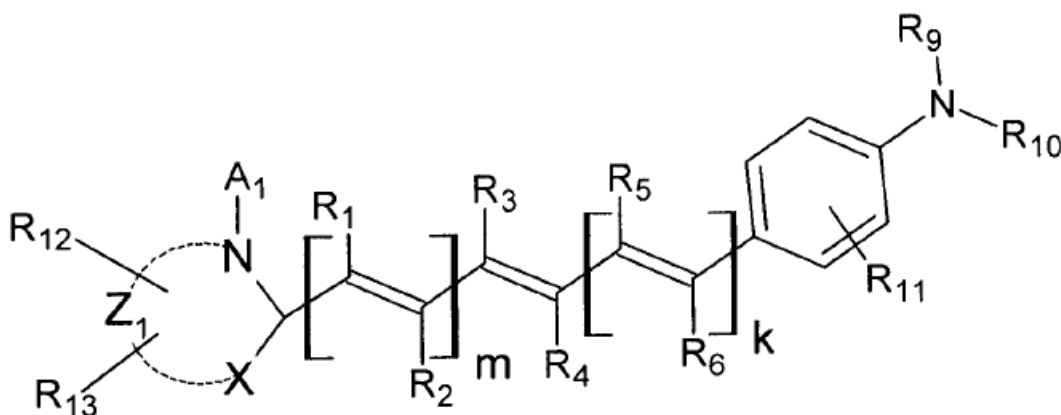
La invención da a conocer además un kit según la invención. El kit comprende a) al menos un compuesto según la invención. Tales compuestos son según la fórmula



Fórmula X



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

15

b) instrucciones para su uso como cromógeno, fluorocromo o ambos, c) opcionalmente al menos una enzima, d) opcionalmente al menos un cofactor para la enzima.

5 Se dan a conocer además kits de tinción múltiple, por ejemplo kits que comprenden compuestos para teñir varios marcadores biológicos en una muestra. La localización de varios marcadores teñidos en combinación permite que se extraiga información más valiosa que a partir de la tinción de un único marcador. Por tanto, la presente invención da a conocer tales kits de tinción múltiple que comprenden compuestos según la invención.

Realizaciones adicionales son en las que el kit comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o incluso 20 o más compuestos según la invención.

10 Incluso realizaciones adicionales son en las que el kit comprende, 2-5, por ejemplo 2-3 ó 4-5 compuestos según la invención.

Realizaciones adicionales son en las que las instrucciones son para realizar un método para detectar una diana según cualquiera de los métodos dados a conocer según la invención.

Realizaciones adicionales son en las que dicha enzima puede procesar un grupo amina aromático (-NH₂), un grupo hidroxilo aromático (-OH) o un grupo fosfato aromático (-PO₄).

15 Realizaciones adicionales son en las que la enzima se conjuga con una molécula de unión que se une a al menos una diana de interés. Se facilitan ejemplos a continuación.

Realizaciones adicionales son en las que en las fórmulas X-XII

20 - las líneas discontinuas Z₁ y Z₂ representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada de los grupos que consisten en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático (-NH₂), o al menos un grupo hidroxilo aromático (-OH), o al menos un grupo fosfato aromático (-PO₄), o una mezcla de los mismos, unidos,

- k y m y n son independientemente 1 ó 0,

- R₁ a R₁₃ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -D y -(B)_i-(D)_j,

25 - X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂- o -CH=CH-, y

- A₁ y A₂ se seleccionan del grupo que consiste en -D y -(B)_i-(D)_j.

Algunas realizaciones son en las que i y j son independientemente cualquier número entre 0-6, tal como 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6.

En algunas realizaciones, i es 1.

30 En algunas realizaciones adicionales, j es 1.

En realizaciones todavía adicionales i es 1 y j es 1.

Realizaciones adicionales son en las que B es un ligador.

Realizaciones adicionales son en las que B es de fórmula general -[B]_i-, y en la que o es un número entero de entre 1-10, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o incluso 10. En una realización, o es 1-3. En otra realización, o es 1.

35 Realizaciones adicionales son en las que B se selecciona del grupo que consiste en cadenas de alquilo ramificadas de 1-20 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, cadenas de alquilo lineales de 1-20 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, monoéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, poliéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o incluso 20 átomos de carbono, y cadenas de polimetina que contienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono, tales como 1, 2, 3, 4, 5, o incluso 6 átomos de carbono; y opcionalmente B puede conectar dos de los grupos A₁, A₂ y R₁₋₇ formando por tanto un sistema de anillos adicional entre dos de A₁, A₂ y R₁₋₇ produciendo de ese modo la parte de cadena de metina central de un sistema de anillos.

45 Realizaciones adicionales son en las que el sistema de anillos adicional es un anillo de 4-6 átomos de carbono, tal como un anillo de 4, 5, o incluso a 6 átomos de carbono.

Realizaciones adicionales son en las que el sistema de anillos adicional es un anillo de 6 átomos de carbono.

Realizaciones adicionales son en las que D que confiere las propiedades deseadas se selecciona del grupo que

consiste en un grupo es sustrato para una enzima, y en el que dicho grupo se selecciona del grupo que consiste en un grupo fosfato, un grupo hidroxilo y un grupo amino.

Realizaciones adicionales son en las que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP).

Realizaciones adicionales son en las que el compuesto es [fórmula IIIa].

5 Realizaciones adicionales son en las que el compuesto es [fórmula IVa].

Realizaciones adicionales son en las que el compuesto es [fórmula IIIb].

Realizaciones adicionales son en las que el compuesto es [fórmula VII].

Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de compuestos según la invención

10 El objetivo de este ejemplo es describir el método de síntesis del compuesto IIIa, IVb, IIIb, V y VI.

La síntesis se explica resumidamente en la figura 10.

Compuestos IIIa, IVb, y IIIb

15 Los compuestos IIIa, IVb y IIIb pueden prepararse siguiendo procedimientos para colorantes de cianina tal como se describió anteriormente en la bibliografía (*Nitration of indoles III Polynitration of 2-alkylindoles*. Journal of the American Chemical Society, 1965. 30: págs. 3457-3469); Mujumdar R.B., *Cytometry*, 10:11-19, 1989) con las siguientes excepciones y modificaciones facilitadas a continuación.

5-Amino-2,3,3-trimetil-(3H)-indol

Se sintetizó 5-amino-2,3,3-trimetil-(3H)-indol tal como sigue:

- Se suspendieron 10,15 g de 5-nitro-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (50 mmol) en 150 ml de metanol.
- 20 - Se añaden 16,6 g de formiato de amonio seguido por 380 mg de Pd al 10%/C.
- Se somete a reflujo durante 3,5 horas.
- Se filtra a través de arena de mar y se elimina el metanol en evaporador rotatorio.
- Se reparte el residuo entre 200 ml de diclorometano y 200 ml de agua. Se extrae la fase acuosa 2 veces con diclorometano.
- 25 - Se evaporan las fases orgánicas combinadas para conseguir el producto en bruto.
- Se recristaliza en heptano.

Rendimiento: 4,06 g (46,9%)

30 En algunos casos se purificaron los compuestos protegidos con Boc mediante cromatografía en gel de sílice usando metanol en diclorometano. Asimismo se purificó el compuesto VII sobre una columna de gel de sílice antes de su uso.

Se eliminaron los grupos de protección Boc según el siguiente procedimiento general:

Se disolvió compuesto protegido con Boc 1 mmol en 8 ml de metanol. Se añadieron 24 ml de ácido trifluoroacético. Tras 1 hora se precipita el compuesto mediante la adición de 400 ml de dietil éter. Se recogió el compuesto mediante filtración y se secó en un desecador. Rendimiento aprox.: 0,5 mmol.

35 *Compuestos V y VI*

Se prepararon los compuestos V y VI tal como se describe en la bibliografía (Shragina L., *et al.*, *Searching for photochromic liquid crystals spironaphthoxazine substituted with a mesogenic group*. Liquid crystals, 1990, 7(5): págs. 643-655) excepto que para la cuaternización del nitrógeno en VI se usó yoduro de etilo en lugar de metilo. Se preparó el compuesto VII a partir del compuesto VI siguiendo los procedimientos descritos para preparar III a partir de II.

40

Ejemplo 2 - Procedimiento para la tinción con IHC de tejidos sobre portaobjetos

El objetivo de este ejemplo es describir un procedimiento general para la tinción de tejido incrustado en parafina. En este ejemplo se usó un anticuerpo frente a citoqueratina en un bloque múltiple que contenía tejido de mama, colon,

riñón y amígdala. La contratinción es opcional puesto que su único fin es hacer que el examen del tejido sea fácil para la persona que lo observa. Sólo es necesario el bloqueo de la peroxidasa si el tejido examinado contiene actividad peroxidasa.

Procedimiento

1. Lavar con xileno	2 x 5 min
2. Lavar con etanol al 96%	2 x 2 min
3. Lavar con etanol al 70%	2 x 2 min
4. Lavar con agua	1 X 1 min
5. Recuperar el antígeno	1 x 48 min
Someter a ebullición durante 10 min usando microondas o	
40 min a 95°C en un baño de agua (DakoCytomation S 1700)	
6. Enfriar hasta temperatura ambiente	20 min
7. Lavar con agua	30 s
8. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
9. Bloquear la peroxidasa (opcional)	5 min
10. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
11. Incubar con anti-citoqueratina (Dakocytomation N 1590)	30 min
12. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
13. Envision + (Dakocytomation K5007)	30 min
14. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
15. Incubar en disolución de colorante (1,5 mmol/ml o 1 mg de compuesto/ml en tampón de sustrato Chemate de DakoCytomation K5007)	10 min
16. Agua	5 min
17. Contratinción (DakoCytomation S 1963) (opcional)	3 min
18. Agua	5 min
19. Montar	

5

Productos de DakoCytomation:

S 1700. Disolución de recuperación de la diana

S 1968. Solución salina tamponada con Tris (TBS) pH 7,6

N 1590. Clon de anticuerpo de ratón monoclonal anti-citoqueratina humana AE1/AE3, listo para usar.

10 K5007. Kit de detección ChemMate™ Envision™, peroxidasa/DAB conejo/ratón.

Sólo se usó el reactivo Envision de este kit como sustrato enzimático, no se usó el componente de diaminobencidina. Se usó la disolución de compuesto en lugar del componente de diaminobencidina)

Ejemplo 3 - Tinción de tejido de colon incrustado en parafina

El objetivo de este ejemplo es demostrar que los compuestos según la fórmula X pueden usarse como cromógeno.

15 Se mantuvieron disoluciones madre de los compuestos en N-metilpirrolidona (20-30 mg/ml) a 5°C. Para la tinción, se diluyeron estas disoluciones madre en el tampón de sustrato Chemate de este kit obtenido a partir del código de Dakocytomation n.º K5007.

La concentración final usada fue 0,5 mg/ml para el uso de cromógeno y 10 µg/ml para aplicaciones fluorescentes.

20 El procedimiento de tinción fue según el ejemplo 2. En las figuras 8a-f se muestra tejido de colon teñido con anti-citoqueratina y visualizado para microscopía óptica o microscopía de fluorescencia con diferentes compuestos de cianina. La figura 8a muestra una referencia en la que se usa AEC (3-amino-9-etilcarbazol) como cromógeno. La figura 8b representa el uso del compuesto IIIa como cromógeno en la que la contratinción es rojo rápido nuclear. La figura 8c representa el uso del compuesto VII como cromógeno. La contratinción es rojo rápido nuclear. La figura 8d representa el uso del compuesto IVa como cromógeno. La figura 8e representa el uso del compuesto IIIb como fluorocromo precipitado. La contratinción es DAPI. La figura 8f muestra el uso del compuesto IVa como fluorocromo precipitado y en la que se usa DAPI como contratinción.

25

Ejemplo 4 - Procedimiento para teñir tejido para microscopía de fluorescencia

El objetivo de este ejemplo es describir un procedimiento general para teñir tejido para microscopía de fluorescencia.

Procedimiento

1. Lavar con xileno	2 x 5 min
---------------------	-----------

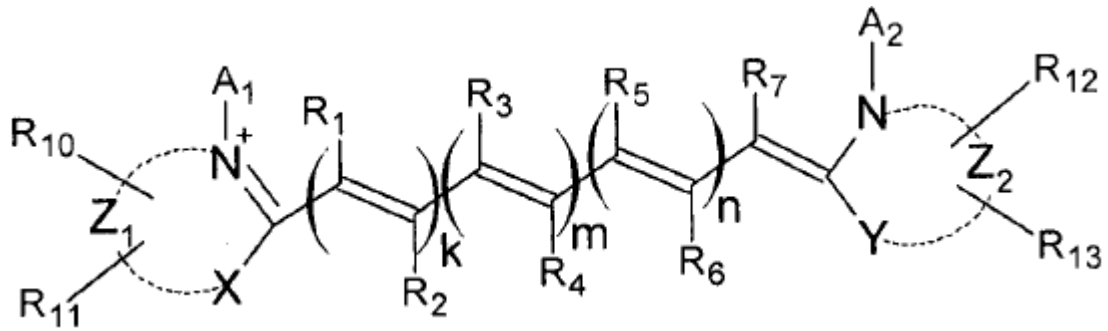
ES 2 606 333 T3

2. Lavar con etanol al 96%	2 x 2 min
3. Lavar con etanol al 70%	2 x 2 min
4. Lavar con agua	1 x 1 min
5. Recuperar el antígeno Someter a ebullición durante 10 min usando microondas o 40 min a 95°C en un baño de agua (DakoCytomation S 1700)	1 x 48 min
6. Enfriar hasta temperatura ambiente	20 min
7. Lavar con agua	30 s
8. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
9. Bloquear la peroxidasa (opcional)	5 min
10. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
11. Incubar con anti-citoqueratina (Dakocytomation N 1590)	30 min
12. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
13. Envision + (Dakocytomation K5007)	30 min
14. Lavar (Dakocytomation S 1968)	5 min
15. Incubar en disolución de colorante (15 nmol/ml o ~10 µg de compuesto/ml en tampón de sustrato Chemate de DakoCytomation K5007)	10 min
16. Agua	5 min

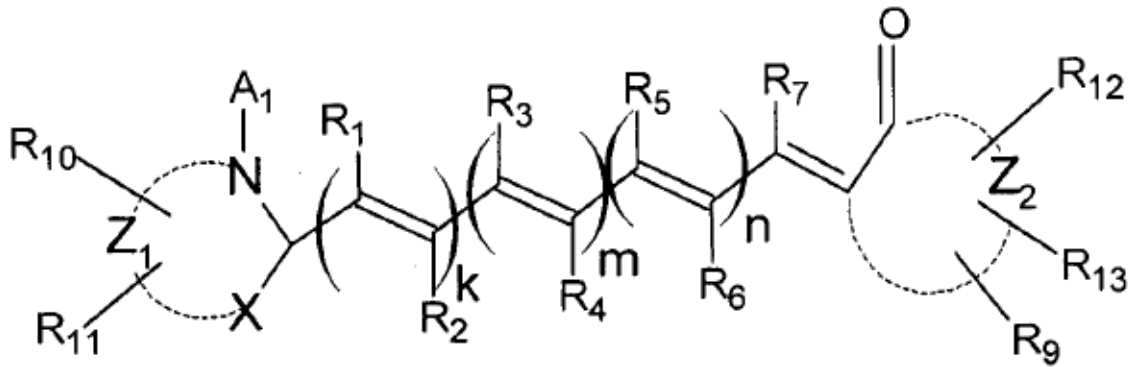
Montar con protector de vector de contiene DAPI.

REIVINDICACIONES

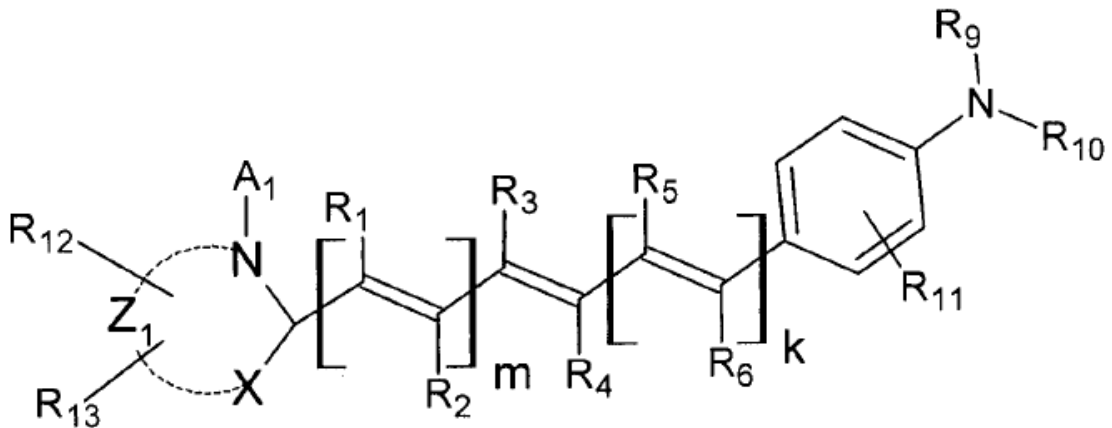
1. Uso de un compuesto según la fórmula



Fórmula X, o



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

en las que

- 10 - las líneas discontinuas Z₁ y Z₂ representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada de los grupos que consisten en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático (-NH₂), o al menos un grupo hidroxilo aromático (-OH), o al menos un grupo fosfato aromático (-PO₄), o una mezcla de los mismos, unidos,
- 15 - k y m y n son independientemente 1 ó 0,
- R₁ a R₁₃ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -D y -(B)_i-(D)_j,
- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂- o -CH=CH-, y

- A₁ y A₂ se seleccionan del grupo que consiste en -D y -(B)_i-(D)_j

- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,

- B es un ligador,

5 - D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

como sustrato para al menos una enzima en el que la al menos una enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP).

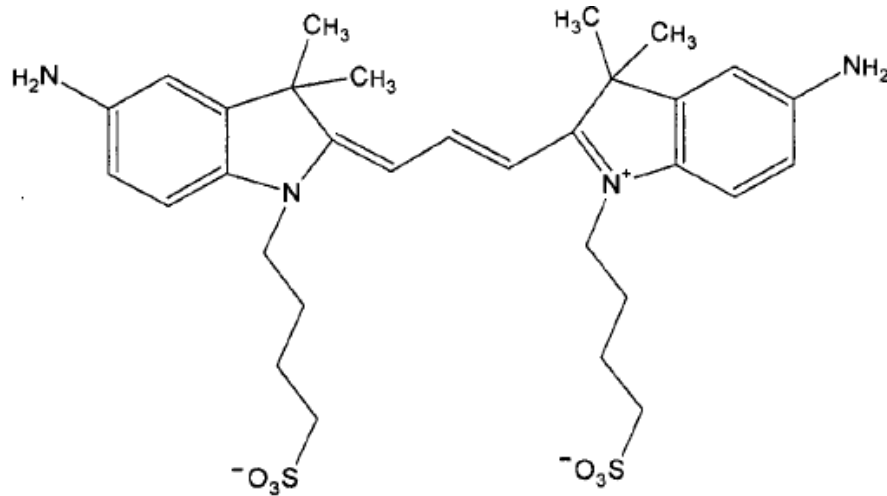
10 2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, en el que B es de fórmula general [-B]_o, y en la que o es un número entero de entre 1-10, preferiblemente B puede seleccionarse del grupo que consiste en cadenas de alquilo ramificadas de 1-20 átomos de carbono, cadenas de alquilo lineales de 1-20 átomos de carbono, monoéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, poliéteres y cadenas de polimetina que contienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la al menos una enzima puede procesar un grupo amina aromático (-NH₂), un grupo hidroxilo aromático (-OH) o un grupo fosfato aromático (-PO₄).

15 4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la al menos una enzima se conjuga con una molécula de unión que puede unirse a al menos una diana de interés.

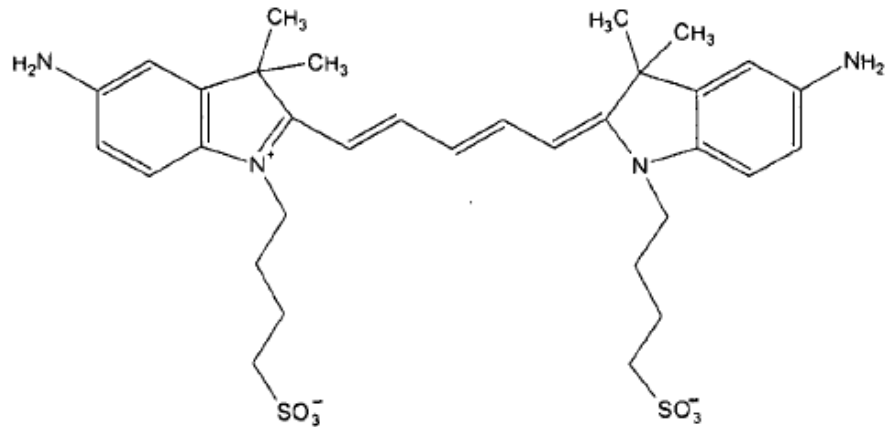
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la al menos una enzima son al menos dos enzimas que son AP y HRP, opcionalmente las al menos dos enzimas se usan en un orden secuencial que es en primer lugar AP, seguida por HRP.

20 6. Uso según cualquiera de la reivindicaciones 1-5, en el que el compuesto es



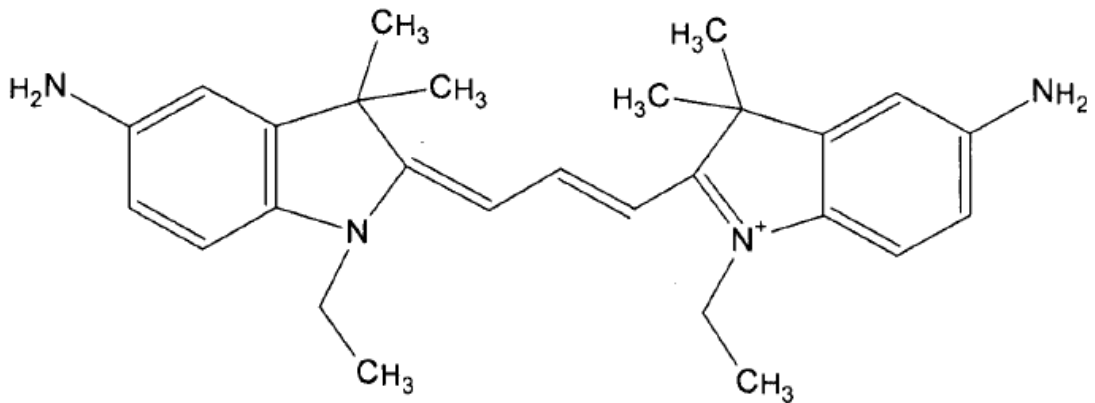
Fórmula IIIa,

o



Fórmula IVa,

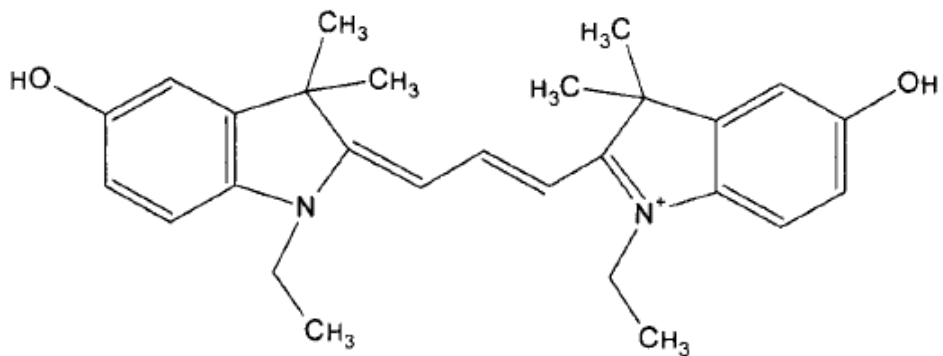
o



Fórmula IIIb,

5

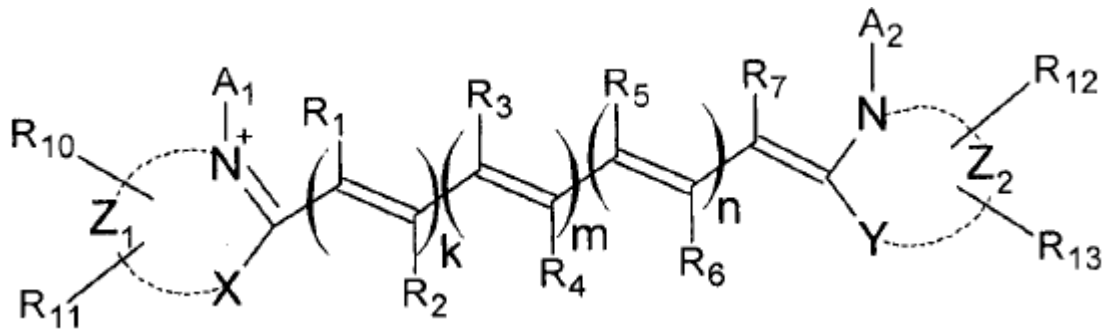
o



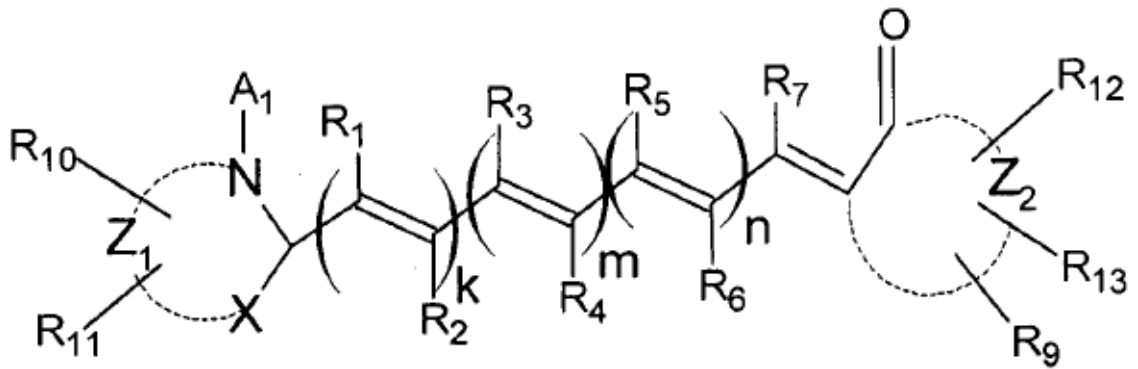
Fórmula VII.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en histoquímica, inmunohistoquímica, citoquímica, inmunocitoquímica, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ISH (hibridación *in situ*), FISH (hibridación *in situ* fluorescente), CISH (hibridación *in situ* de cromógenos), citometría de flujo.
8. Método para precipitar un compuesto según la fórmula

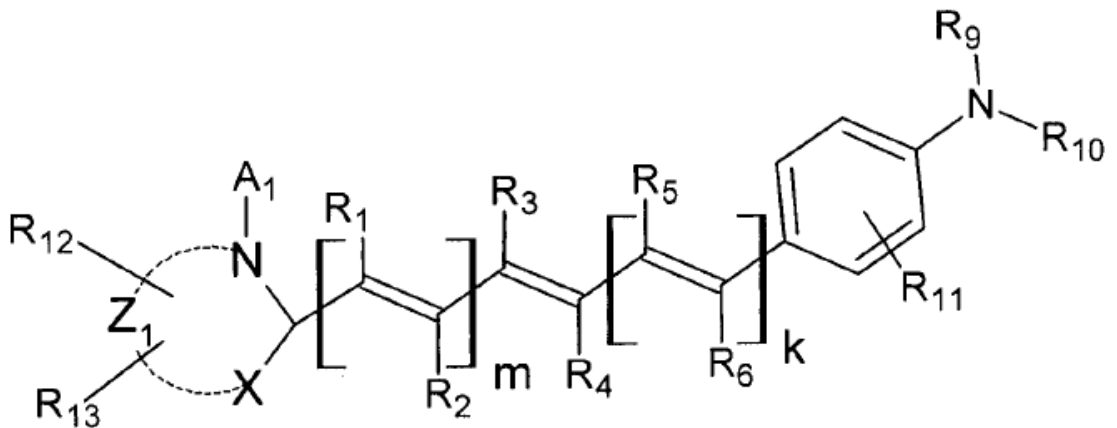
10



Fórmula X, o



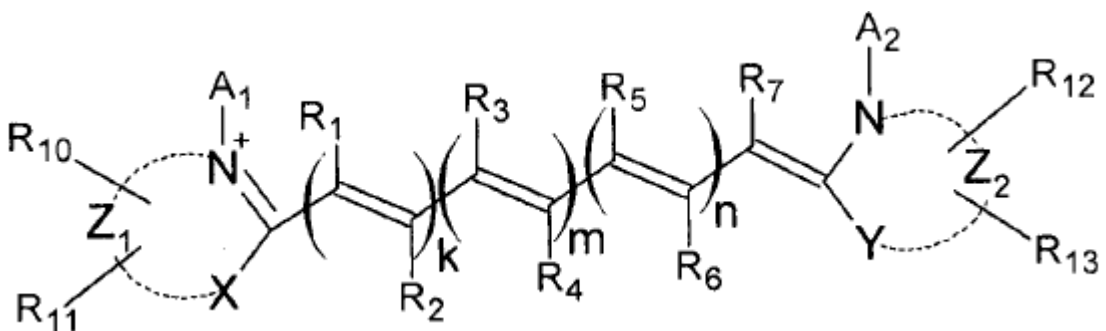
Fórmula XI, o



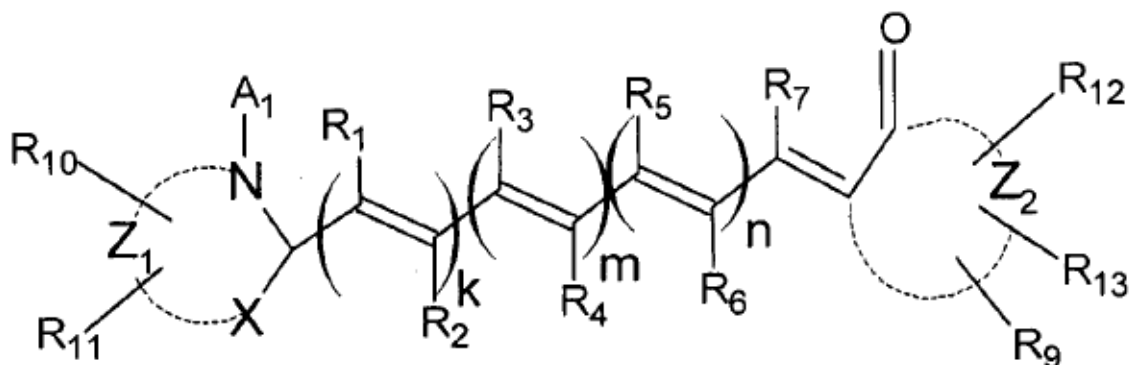
Fórmula XII,

comprendiendo el método las etapas de

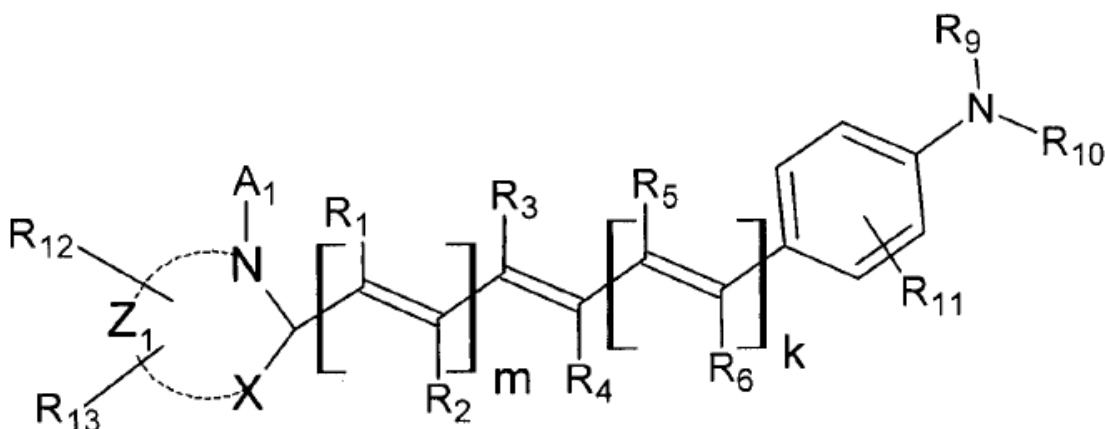
a) proporcionar dicho compuesto según la fórmula



Fórmula X, o



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

5

en el que en las fórmulas X-XII

10

- las líneas discontinuas Z_1 y Z_2 representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada de los grupos que consisten en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático ($-NH_2$), o al menos un grupo hidroxilo aromático ($-OH$), o al menos un grupo fosfato aromático ($-PO_4$), o una mezcla de los mismos, unidos,

- k y m y n son independientemente 1 ó 0,

- R_1 a R_{13} se seleccionan individualmente del grupo que consiste en $-(D)_j$ y $-(B)_i-(D)_j$,

- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, $-C(CH_3)_2-$ o $-CH=CH-$, y

15

- A_1 y A_2 se seleccionan del grupo que consiste en $-(D)_j$ y $-(B)_i-(D)_j$,

- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,

- B es un ligador,

- D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

20

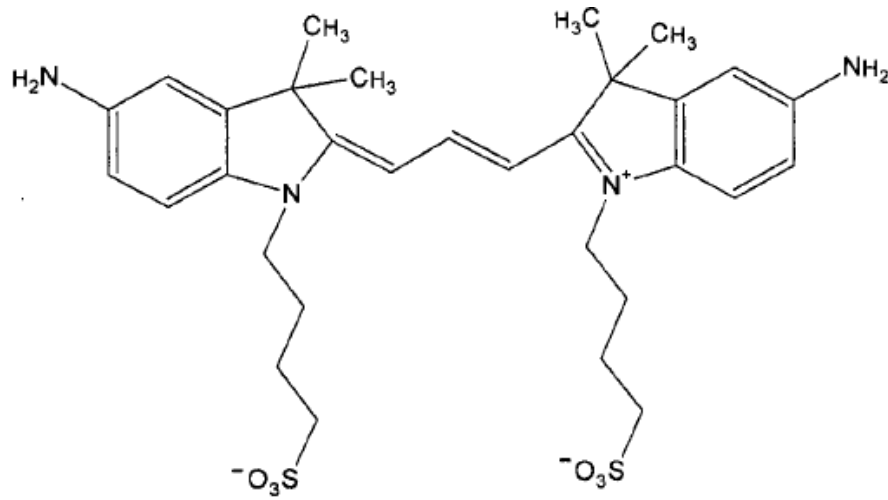
b) proporcionar una enzima, en la que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

e) poner en contacto el compuesto según la invención con dicha enzima,

d) opcionalmente proporcionar un cofactor,

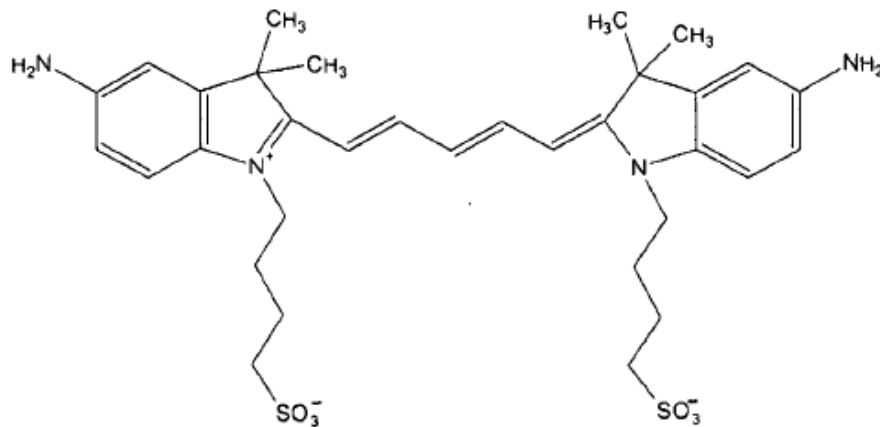
en el que dicho compuesto forma un precipitado.

9. Método para precipitar un compuesto según la reivindicación 8, en el que B es de fórmula general $[-B]_0$, y en la que o es número entero de entre 1-10, preferiblemente B puede seleccionarse del grupo que consiste en cadenas de alquilo ramificadas de 1-20 átomos de carbono, cadenas de alquilo lineales de 1-20 átomos de carbono, monoéteres que contienen desde 2-20 átomos de carbono, poliéteres y cadenas de polimetina que contienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono.
10. Método según la reivindicación 8-9, en el que la enzima puede procesar un grupo amina aromático ($-NH_2$), un grupo hidroxilo aromático ($-OH$), o un grupo fosfato aromático ($-PO_4$).
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que la enzima se conjuga con una molécula de unión que puede unirse a al menos una diana de interés.
12. Método según la reivindicación 8-11, en el que el compuesto es



Fórmula IIIa,

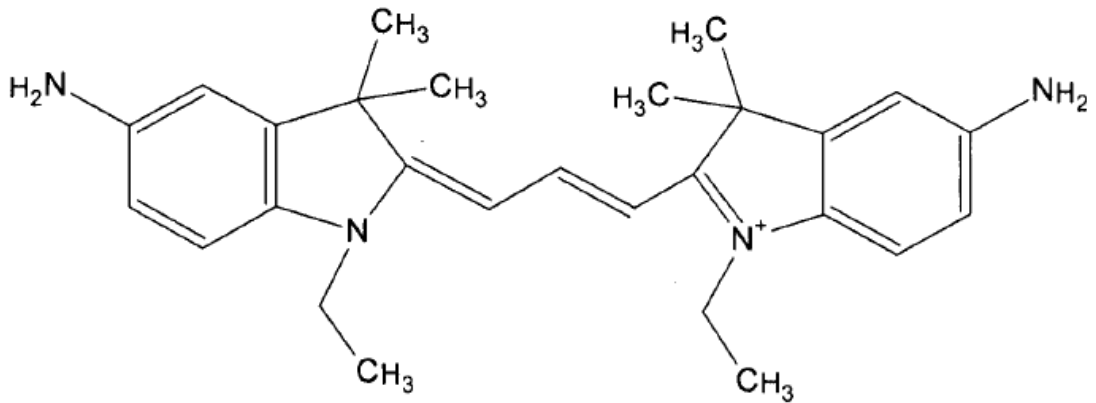
o



Fórmula IVa,

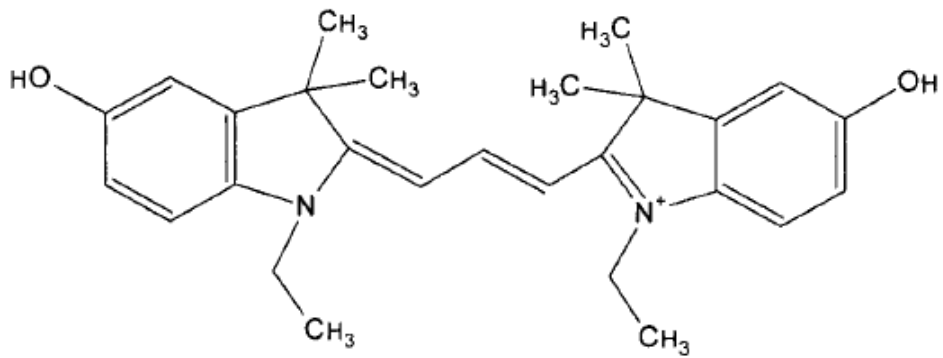
15

o



Fórmula IIIb,

o

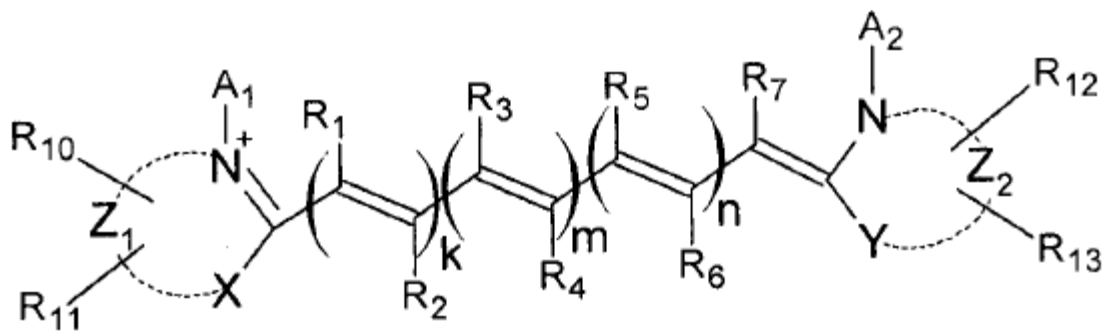


Fórmula VII.

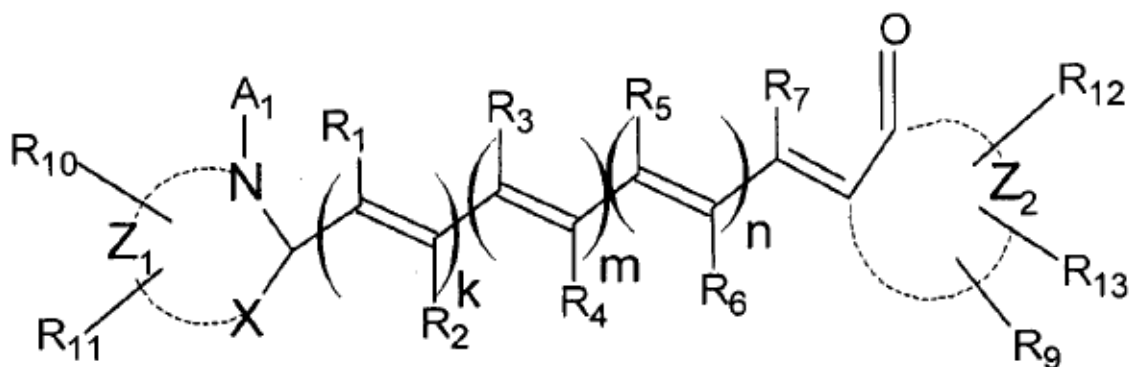
5

13. Método para detectar una diana, comprendiendo el método las etapas de

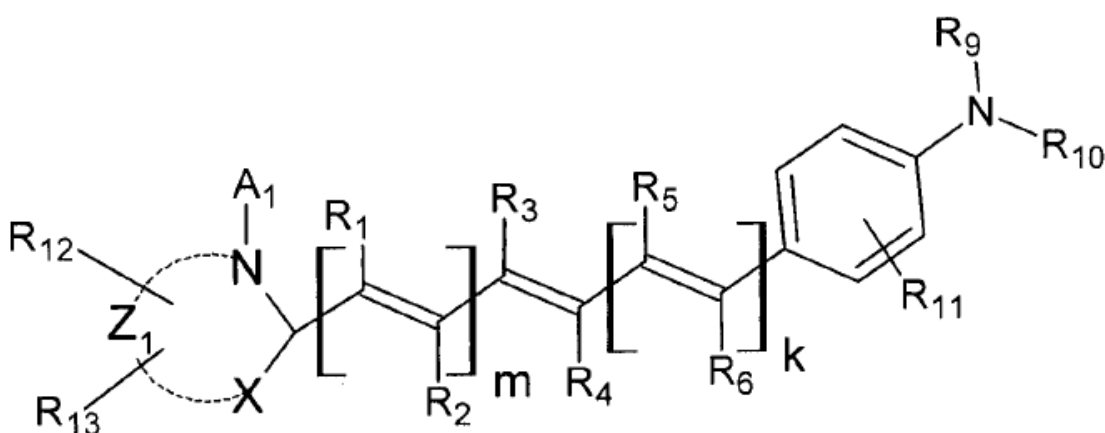
a) proporcionar al menos un compuesto según la fórmula



Fórmula X, o



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

5 en el que en las fórmulas X-XII

- las líneas discontinuas Z₁ y Z₂ representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada de los grupos que consisten en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 3 ó 4 ó 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático (-NH₂), o al menos un grupo hidroxilo aromático (-OH), o al menos un grupo fosfato aromático (-PO₄), o una mezcla de los mismos, unidos,

10

- k y m y n son independientemente 1 ó 0,

- R₁ a R₁₃ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en -(D)_j y -(B)_i-(D)_j,

- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, -C(CH₃)₂- o -CH=CH-, y

- A₁ y A₂ se seleccionan del grupo que consiste en -(D)_j y -(B)_i-(D)_j,

15

- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,

- B es un ligador,

- D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

20

b) proporcionar al menos una enzima, en el que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

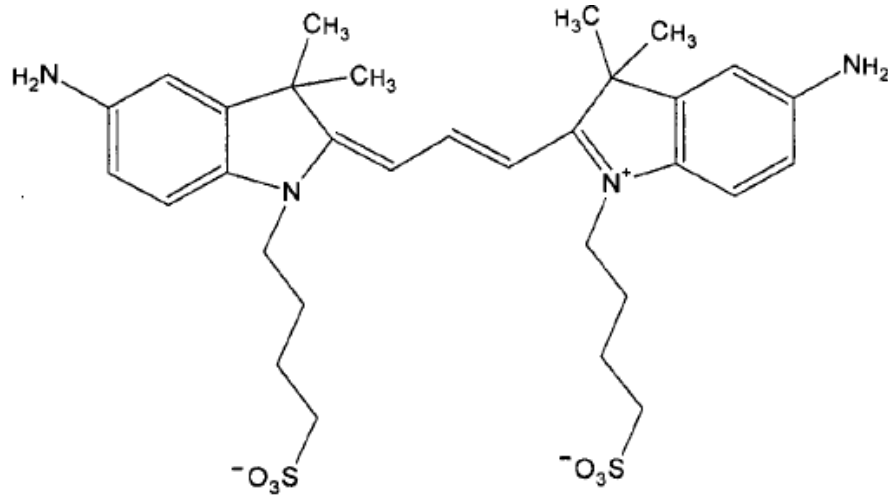
c) poner en contacto el compuesto según la invención con dicha enzima,

d) opcionalmente proporcionar un cofactor, y

e) detectar dicho precipitado,

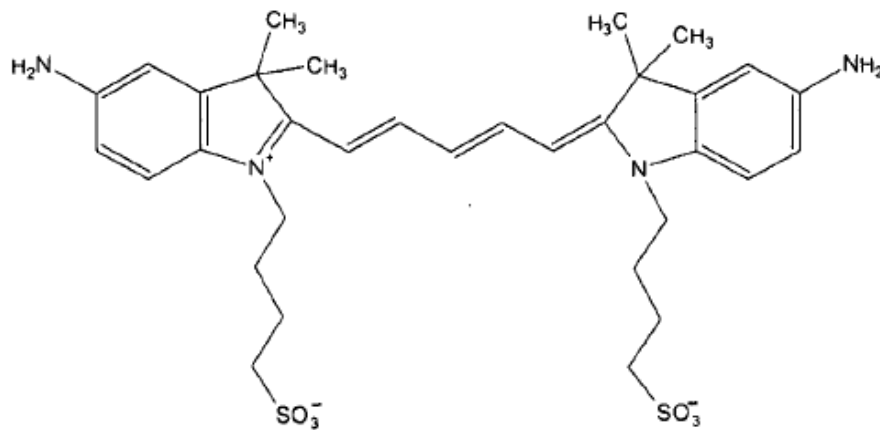
en el que la detección de dicho precipitado es una detección directa o indirecta de dicha diana.

14. Método según la reivindicación 13, en el que la enzima puede procesar un grupo amina aromático (-NH₂), un grupo hidroxilo aromático (-OH) o un grupo fosfato aromático (-PO₄).
15. Método según la reivindicación 13 ó 14, en el que la enzima se conjuga con una molécula de unión que puede unirse a al menos una diana de interés.
- 5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que el compuesto es



Fórmula IIIa,

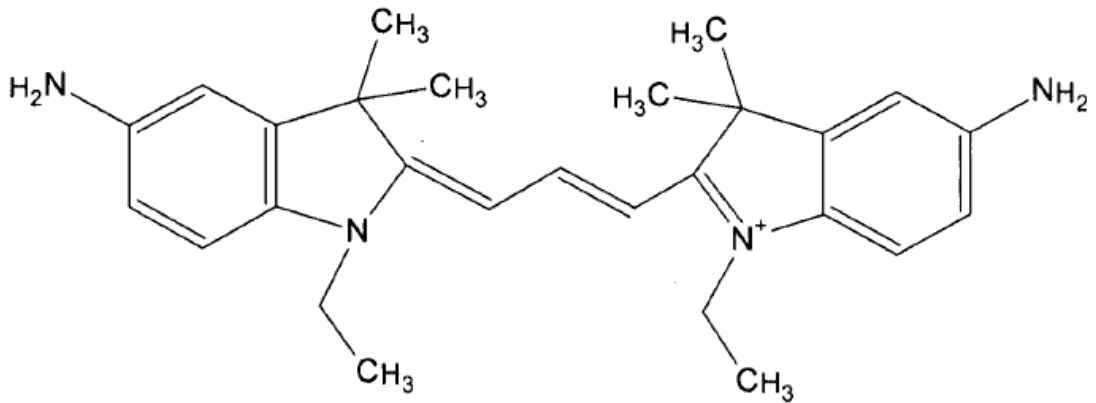
o



Fórmula IVa,

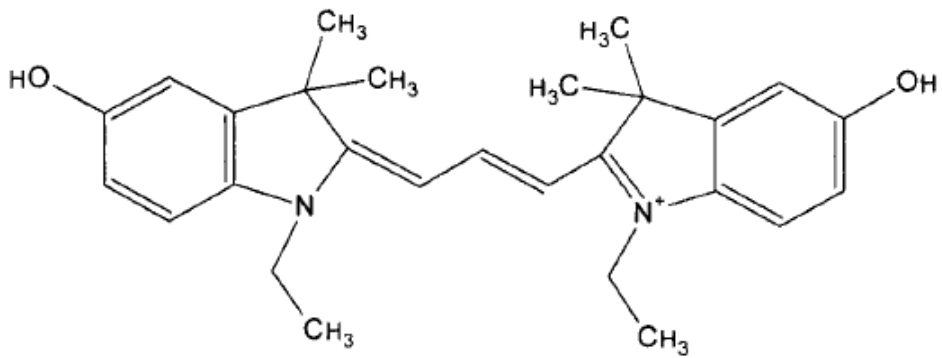
10

o



Fórmula IIIb,

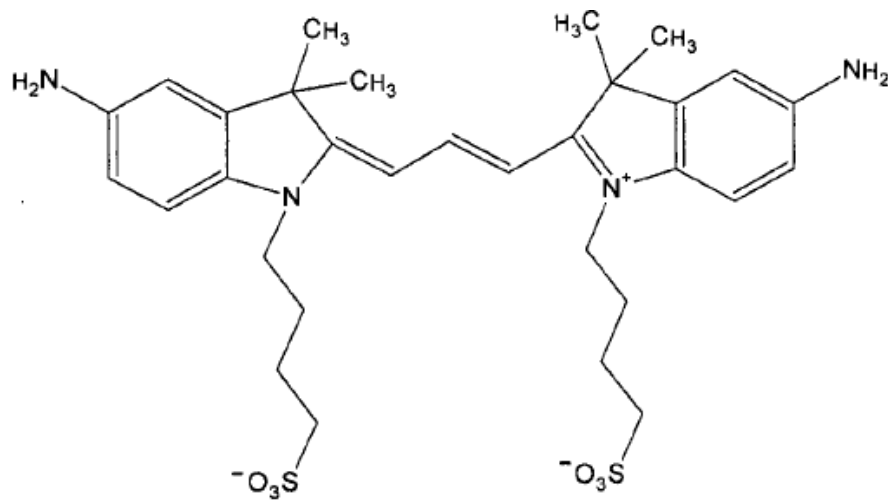
o



Fórmula VII.

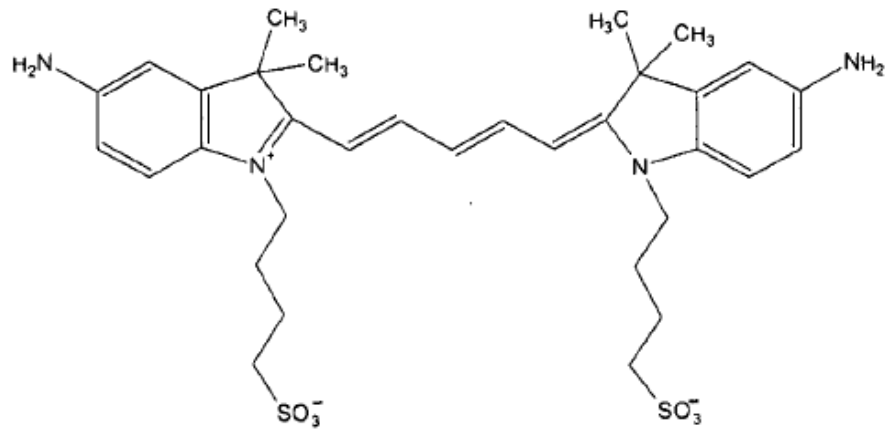
5

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que el precipitado se detecta mediante microscopía.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en el que la microscopía se realiza manualmente o mediante exploración automática.
- 10 19. Compuesto según la fórmula



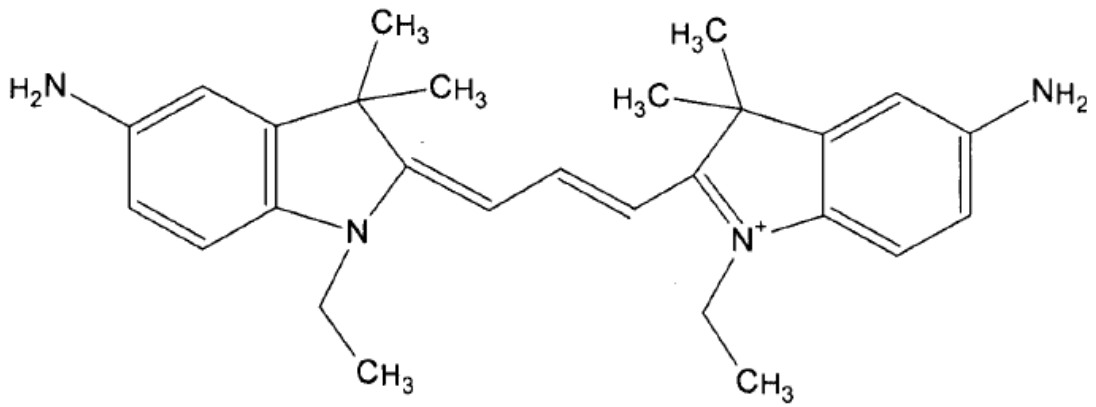
Fórmula IIIa,

o



Fórmula IVa,

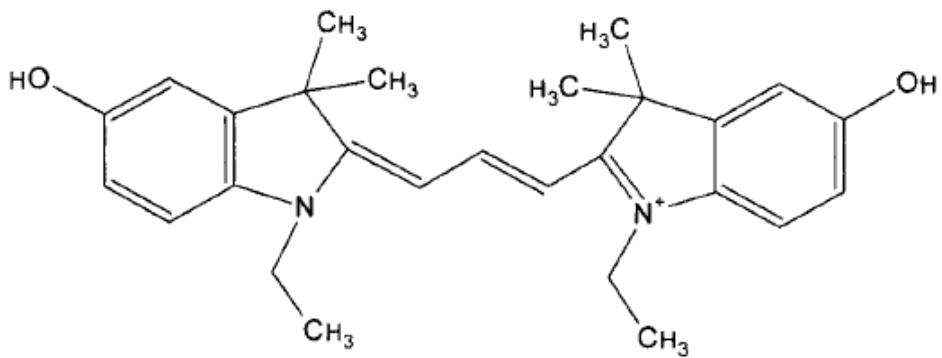
o



5

Fórmula IIIb,

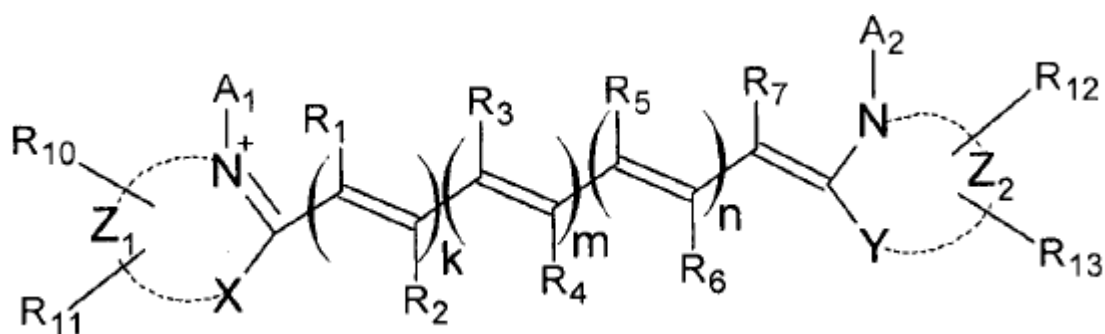
o



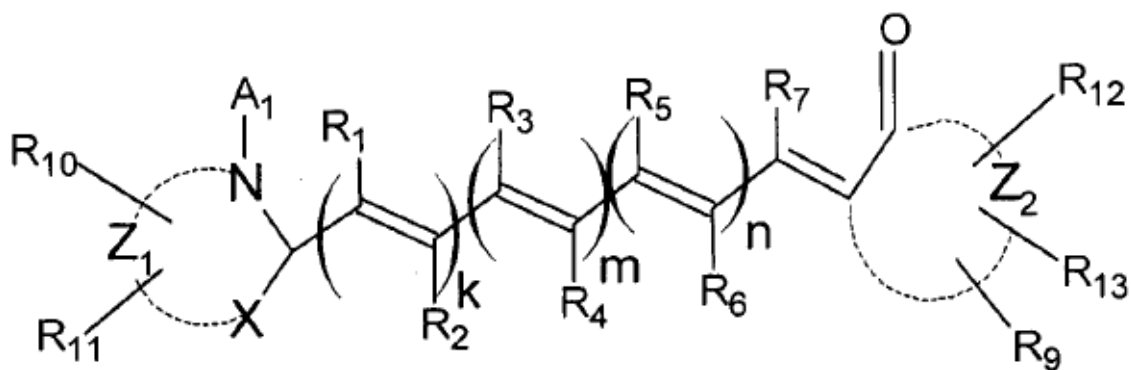
Fórmula VII.

10 20. Kit que comprende

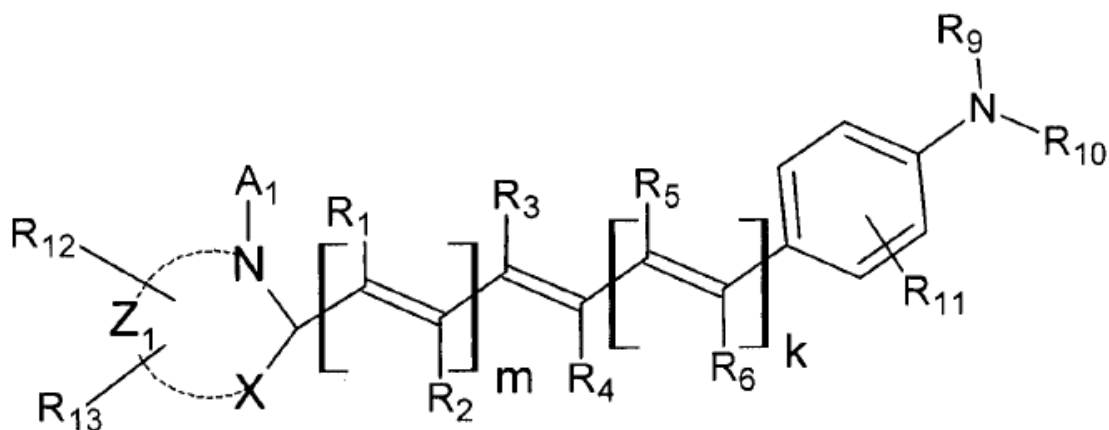
a) al menos un compuesto según la fórmula



Fórmula X,



Fórmula XI, o



Fórmula XII,

en el que en las fórmulas X-XII

- las líneas discontinuas Z_1 y Z_2 representan los átomos necesarios para completar la fórmula seleccionada de los grupos que consisten en un anillo, dos anillos condensados y tres anillos condensados teniendo cada dicho anillo 5 ó 6 átomos de carbono y en las que al menos uno de dichos anillos tiene al menos un grupo amina aromático ($-\text{NH}_2$), o al menos un grupo hidroxilo aromático ($-\text{OH}$), o al menos un grupo fosfato aromático ($-\text{PO}_4$), o una mezcla de los mismos, unidos,
- k y m y n son independientemente 1 ó 0,
- R_1 a R_{13} se seleccionan individualmente del grupo que consiste en $-(D)_j$ y $-(B)_i-(D)_j$,
- X e Y pueden ser independientemente oxígeno, azufre, selenio, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ o $-\text{CH}=\text{CH}-$, y
- A_1 y A_2 se seleccionan del grupo que consiste en $-(D)_j$ y $-(B)_i-(D)_j$,
- i y j son independientemente cualquier número entre 0-6,

- B es un ligador,

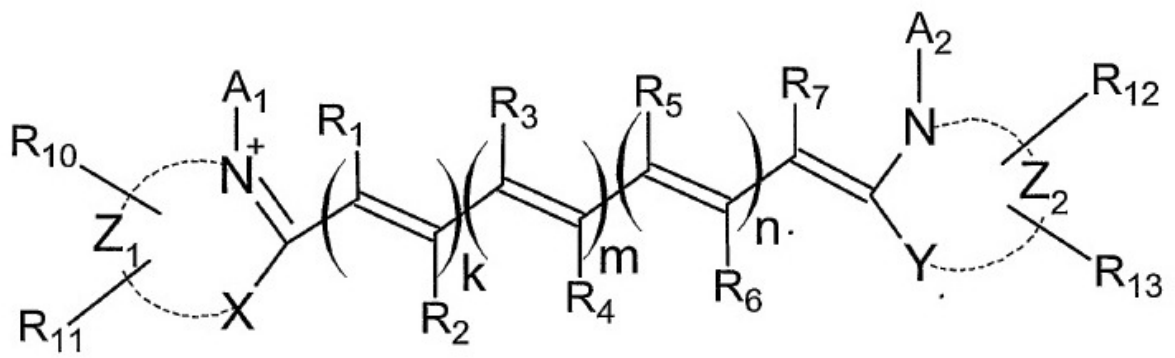
- D se selecciona del grupo que consiste en grupos que son sustrato para una enzima seleccionada del grupo de grupos fosfato, hidroxilo y amino;

5

b) instrucciones para su uso como sustrato para al menos una enzima, en el que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

c) opcionalmente al menos una enzima, en el que dicha enzima es peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP),

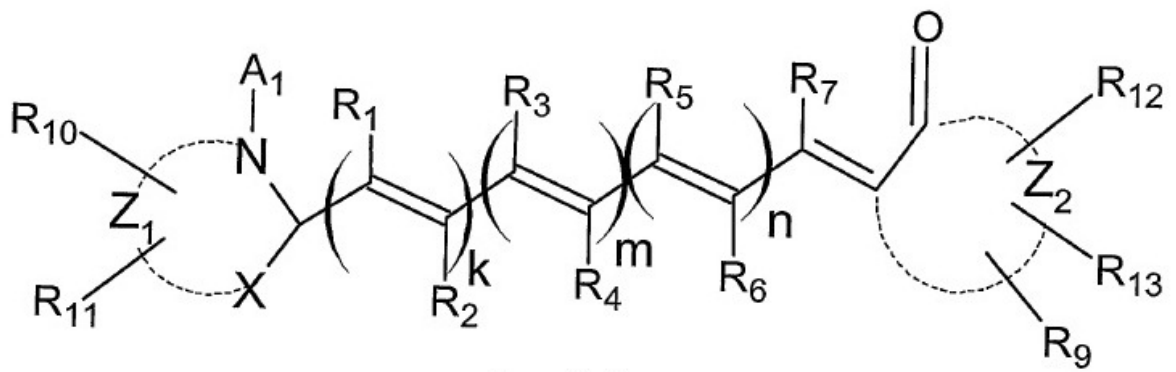
d) opcionalmente al menos un cofactor para la enzima.



Cianina

Fórmula X

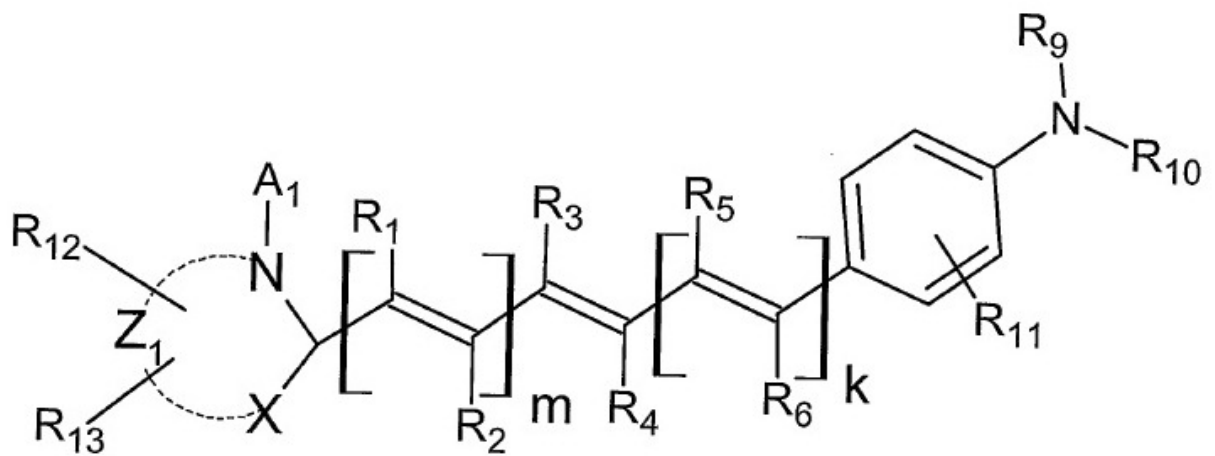
Figura 1



Merocianina

Fórmula XI

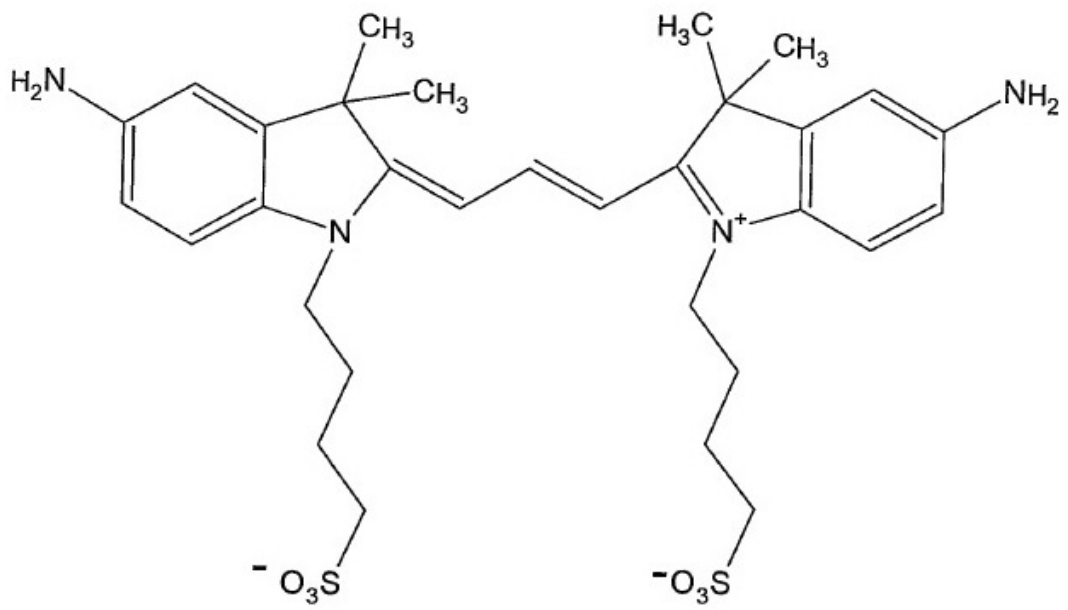
Figura 2



Estirilo

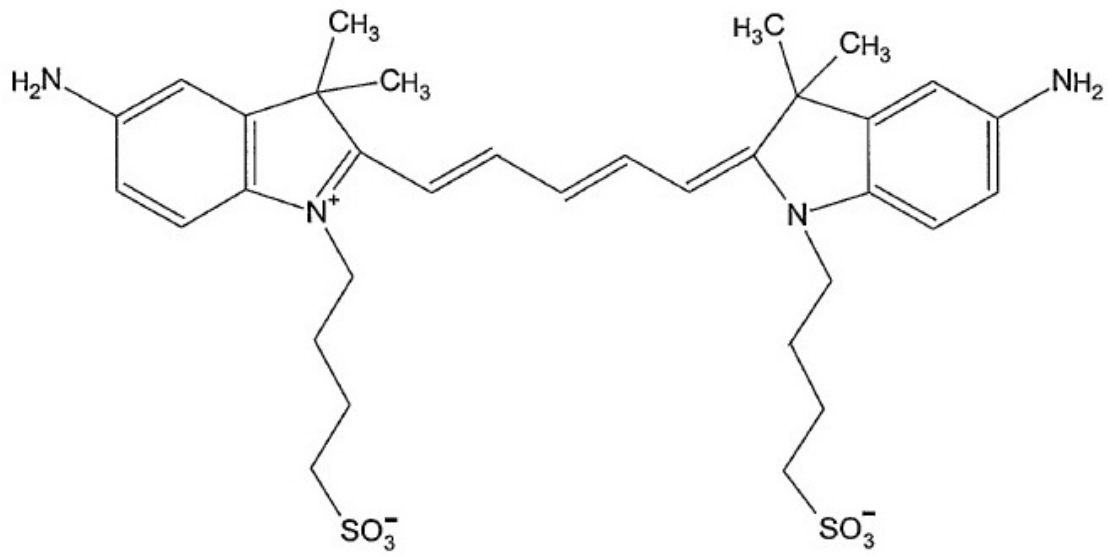
Fórmula XII

Figura 3



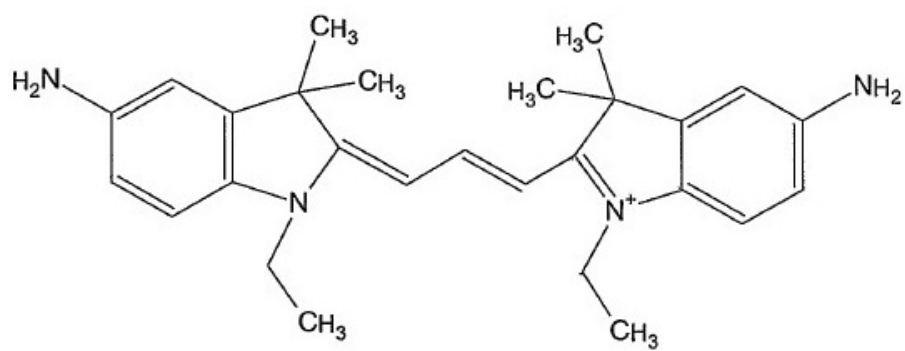
Compuesto IIIa

Figura 4



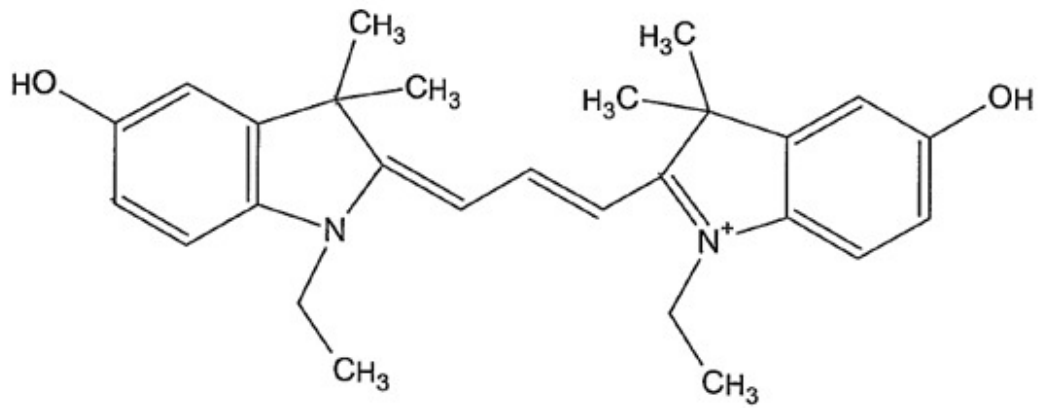
Compuesto IVa

Figura 5



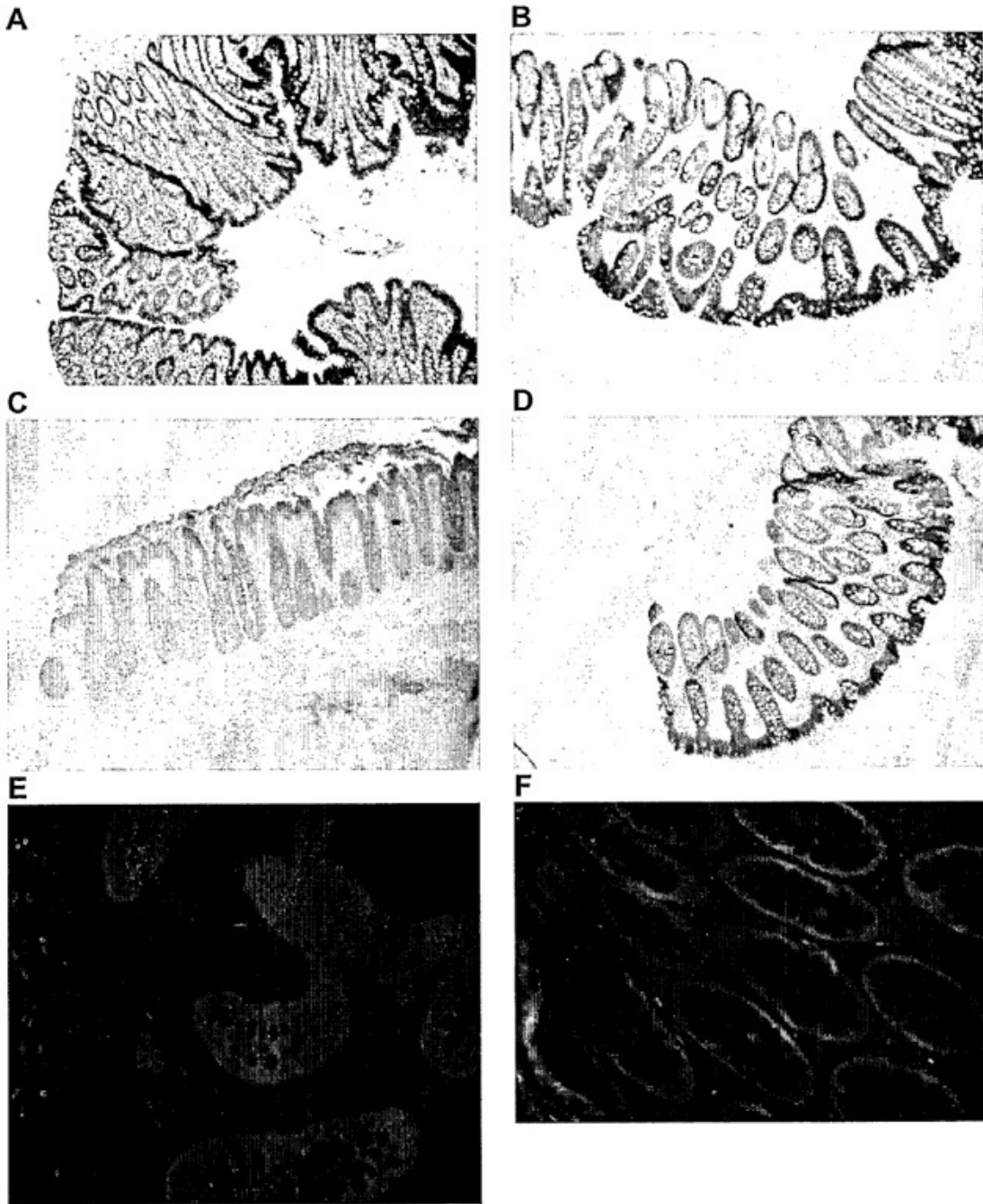
Compuesto IIIb

Figura 6



Compuesto VII

Figura 7



Figuras 8a-f

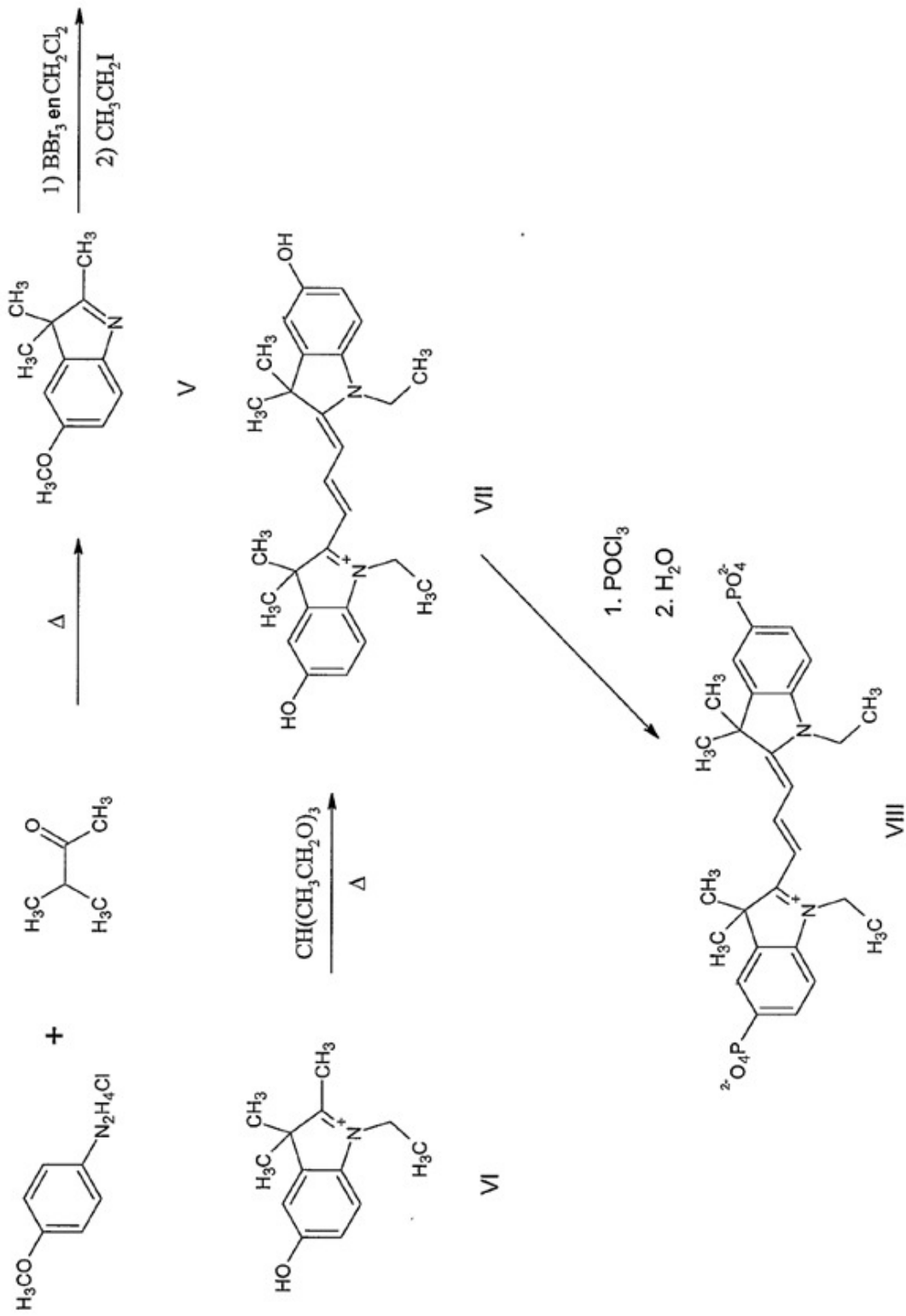


Figura 9

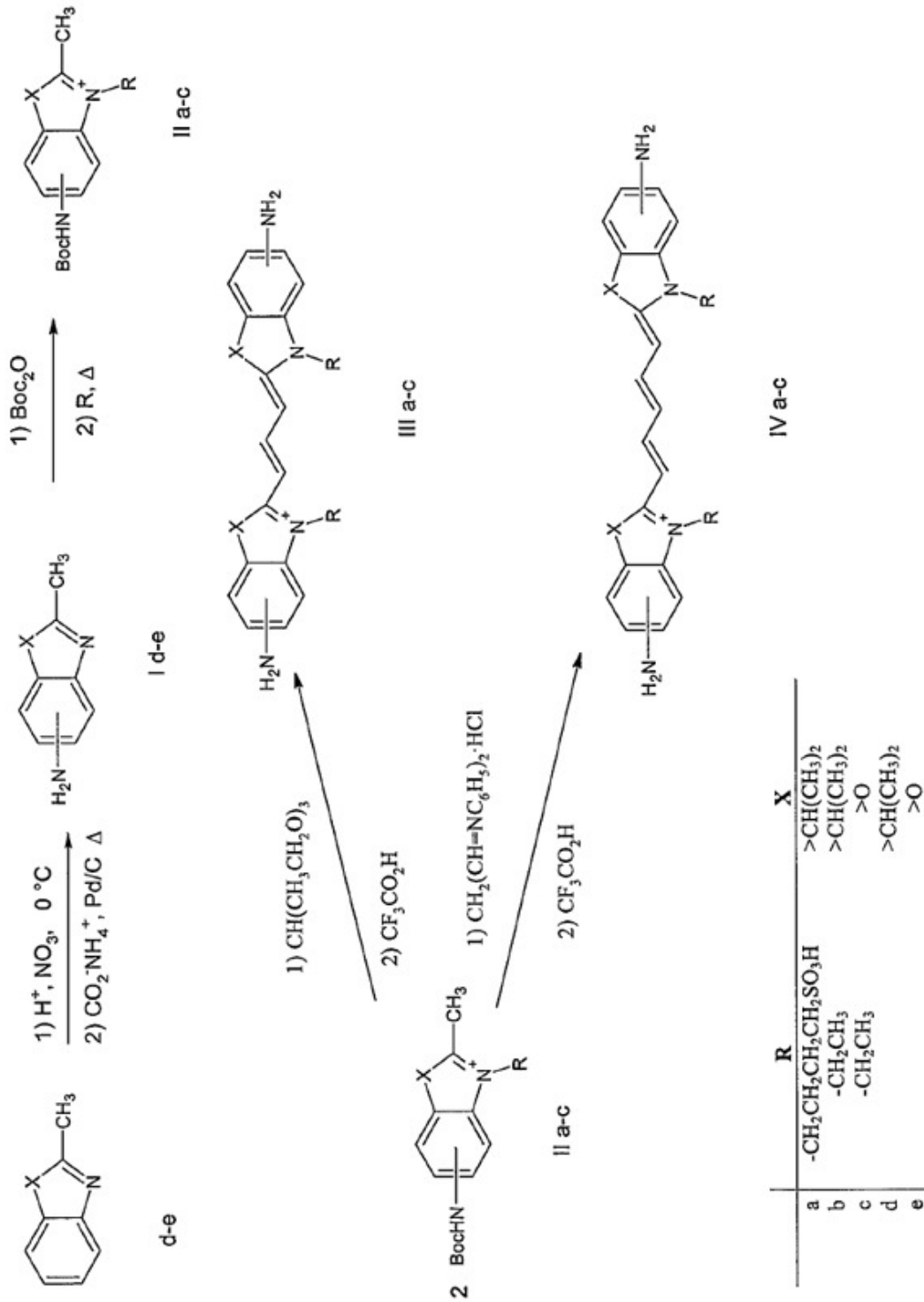


Figure 10

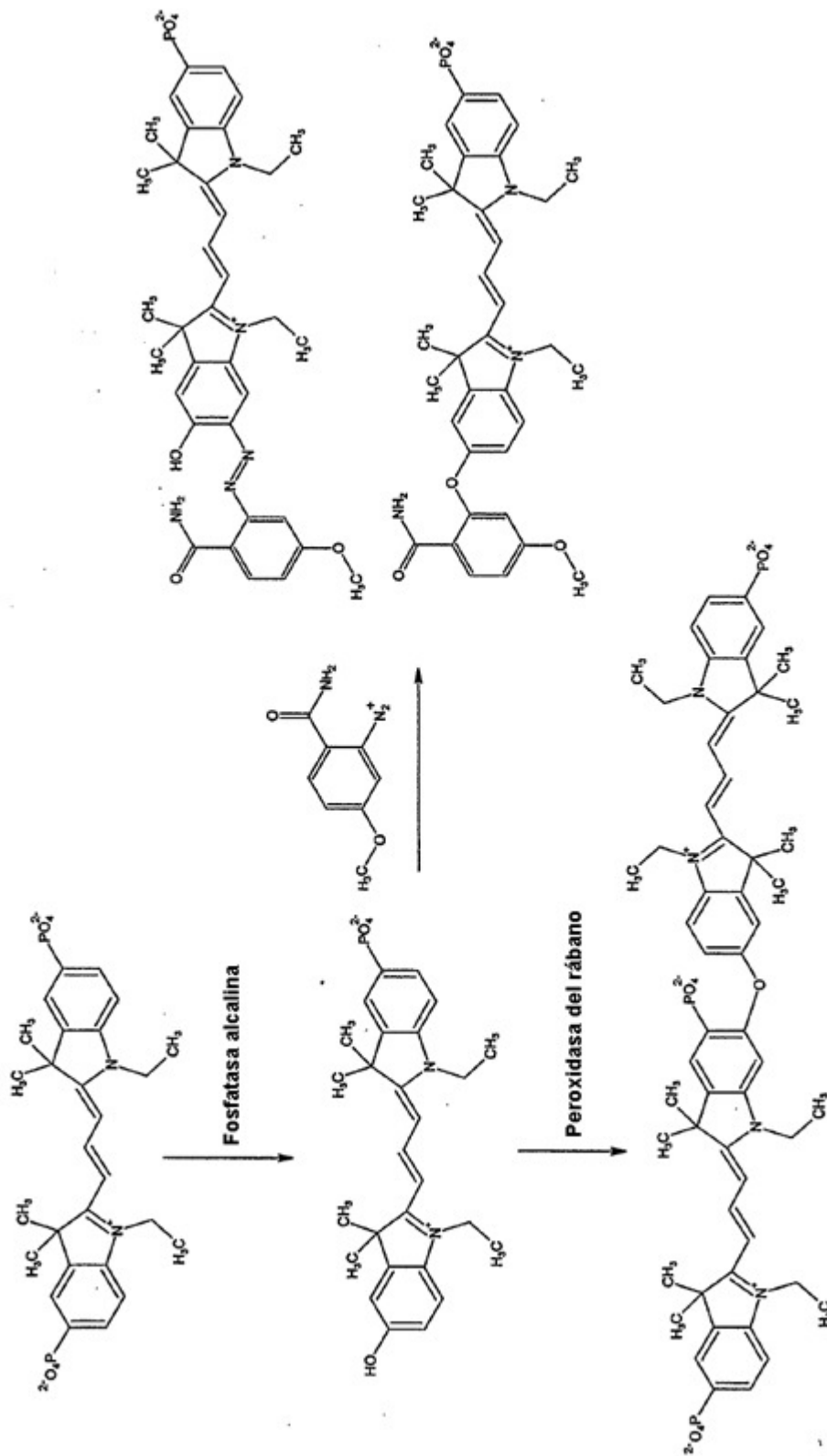


Figura 11