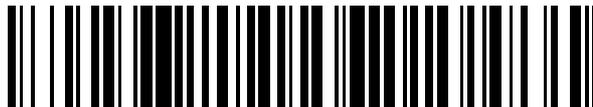


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 529**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/532** (2006.01)

**G01N 33/533** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**C09B 23/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2013 PCT/US2013/066459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2013 E 13849442 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2912464**

54 Título: **Tintes de cianina-azaindolina sustituidos con hidroxamato, y bioconjugados de los mismos**

30 Prioridad:

**24.10.2012 US 201261717983 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.08.2017**

73 Titular/es:

**Becton Dickinson and Company  
One Becton Drive  
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**DIWU, ZHENJUN;  
GUO, HAITAO;  
HAN, XING;  
SCHULTZ, MIRION y  
DUBROVSKY, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU SLP, .**

ES 2 628 529 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

Tintes de cianina-azaindolina sustituidos con hidroxamato, y bioconjugados de los mismos

**Solicitudes relacionadas por referencia**

5 De conformidad a la U.S.C. 35 119 (e), esta solicitud reivindica la prioridad a la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie N° 61/717.983, presentada el 24 de Octubre de 2012.

**Introducción**

10 Las sondas fluorescentes son herramientas valiosas para detecciones biológicas en una gran cantidad de aplicaciones, que incluyen aplicaciones en histología, citología e inmunología. Específicamente, las sondas fluorescentes encuentran utilidad en la identificación y separación de subpoblaciones de células en una mezcla de células, mediante citometría de flujo, separación de células activadas por fluorescencia y, microscopio de fluorescencia; determinación de la concentración de restos de unión (por ejemplo, unión de antígeno-anticuerpo) en inmunoensayos de fluorescencia; localización de sustancias mediante tinción en geles u otros soportes. Los compuestos fluorescentes pueden unirse covalentemente o no covalentemente a otros materiales para impartir fluorescencia. Los tintes fluorescentes brillantes permiten la detección o localización de los materiales unidos, con gran sensibilidad.

15 Cuando se emplean tintes fluorescentes para los propósitos anteriores, existen muchas consideraciones acerca de la elección del tinte fluorescente. Una consideración son la absorción y la emisión características del tinte fluorescente, ya que muchos ligandos, receptores, y materiales en la muestra bajo ensayo, por ejemplo, sangre, orina, líquido cerebrospinal, tendrán fluorescencia e interferirán con una determinación precisa de la fluorescencia del marcador fluorescente. Este fenómeno se denomina autofluorescencia o fluorescencia de fondo. Otra consideración es la capacidad del tinte fluorescente para conjugarse con los ligandos y receptores, y otros materiales biológicos o no, y los efectos potenciales de tal conjugación sobre las propiedades de las moléculas, tal como cambios en la eficiencia cuántica del tinte fluorescente. Es también posible que la conjugación con el tinte fluorescente inactive la función de la molécula que está marcada. Una tercera consideración es la eficiencia cuántica del tinte fluorescente, que debería ser alta para una detección sensible. Una cuarta consideración es la capacidad de absorción de luz, o coeficiente de extinción, del tinte fluorescente, que debería ser también todo lo mayor como sea posible. También es interesante si las moléculas interactuarán entre sí cuando estén próximas, dando como resultado un auto-apagamiento. Una quinta consideración es la fotoestabilidad del tinte marcador, ya que los conjugados de tinte a menudo se someten a una radiación repetida para la detección óptima. Una consideración adicional es si hay unión no específica del tinte fluorescente a otros compuestos o paredes del recipiente, bien por sí mismo o junto con el compuesto al cual se conjuga el tinte fluorescente.

20 Por lo tanto, son de interés los tintes y conjugados fluorescentes que tienen una o más propiedades, tal como alta eficiencia cuántica, buena fotoestabilidad, absorción y emisión con elevadas longitudes de onda, mayor rendimiento de conjugación, baja interferencia no específica, baja extinción y baja auto-agregación.

**35 Compendio**

Se proporcionan tintes de cianina y azaindolina sustituidos con hidroxamato, los bioconjugados, y los métodos de uso de los mismos. El tinte de la invención incluye una estructura de tinte de cianina que tiene un anillo de azaindolina, donde un resto de piridio se incorpora en la estructura del anillo de indol para formar el anillo de azaindolina, y un resto de hidroxamato se une a un anillo de azaindolina como un sustituyente. En algunos casos, el resto de hidroxamato se incorpora en la posición 5 del anillo de azaindolina. Los tintes incluyen además, un resto de grupo reactivo (RGM, de sus siglas en inglés) en una o más de las distintas posiciones.

40 Aspectos de la invención incluyen tintes de cianina y azaindolina sustituidos con hidroxamato, y sus conjugados, donde un tinte de la invención se conjuga con un sustrato de interés. En algunos casos, el sustrato incluye un resto de unión que se une específicamente a un analito de interés. En determinados casos, el conjugado de tinte es un tándem conjugado donde el tinte se conjuga con una proteína fluorescente. El tinte puede ser capaz de transferir energía fluorescente mediante resonancia (FRET) con la proteína fluorescente conjugada. El conjugado proteína fluorescente-tinte se puede conjugar además con un resto de unión, que se une específicamente a un analito de interés.

45 Se proporcionan los métodos para detectar un analito en una muestra. Aspectos del método incluyen poner en contacto la muestra con un reactivo de detección. En algunos casos, el tinte de detección es un tinte conjugado que incluye un resto de unión específico, que se une específicamente al analito. En algunos casos, el agente de detección es un tinte reactivo, que se conjuga con el analito. Aspectos del método incluyen además, la detección del analito mediante fluorescencia. Los compuestos y conjugados de tinte se emplean en la localización o detección de la interacción o presencia de analitos o ligandos en una muestra. Se proporcionan también composiciones, por ejemplo, kits, etc, que incorporan tales tintes o conjugados de tinte, que facilitan su empleo en tales métodos.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el espectro de absorción del Compuesto 26 (derecha) y Cy5 (izquierda) en tampón PBS (pH=7,4). La longitud de onda de máxima absorción del Compuesto 26 es hacia el rojo mediante ~63 nm comparado a Cy5.

- 5 La Figura 2 muestra el espectro de fluorescencia del Compuesto 26 (derecha) y Cy5 (izquierda) en tampón PBS (pH=7,4, excitado a 630 nm). La longitud de onda de máxima fluorescencia del Compuesto 26 es hacia el rojo mediante ~63 nm comparado a Cy5.

La Figura 3 ilustra una comparación de fotoestabilidad de los Compuestos 12, 48 y 55 con el éster NHS Alexa Fluor® 700 en tampón PBS (pH 7,4) (Ejemplo 43).

- 10 La Figura 4 ilustra una comparación de fotoestabilidad de tándems APC-Compuesto 12, 48, 50, 53 y 54 con el tándem APC- Alexa Fluor® 700 en tampón PBS (pH 7,4) (Ejemplo 43).

La Figura 5 muestra un esquema de síntesis de un tinte de cianina-azaindolina sustituido con hidroxamato, que incluye un ligando al resto del grupo reactivo (L-RGM) unido al hidroxamato.

- 15 La Figura 6 muestra una síntesis de una cianina-azaindolina sustituida con hidroxamato que incluye un anillo de indolina sustituido con un L-RGM .

La Figura 7 muestra una síntesis de una cianina-azaindolina que incluye dos grupos L-RGM localizados respectivamente en el hidroxamato y en el resto de indolina.

- 20 La Figura 8 muestra los datos de la tinción inmunológica obtenidos empleando conjugados de tinte-anticuerpo del anticuerpo CD8 con los Compuestos 12 y 48, respectivamente, en comparación con el conjugado CD8-Alexa Fluor® 700.

La Figura 9 muestra los datos de la tinción inmunológica obtenidos empleando un conjugado de tinte-anticuerpo del anticuerpo CD20 con el Compuesto 12 en comparación a APC-H7.

- 25 La Figura 10 muestra los datos de la tinción inmunológica obtenidos empleando conjugados de un tándem tinte-anticuerpo del anticuerpo CD8 marcado con APC-Compuesto 12 en comparación a APC-Cy5,5 y APC-Alexa Fluor® 700.

La Figura 11 muestra los datos de la tinción inmunológica obtenidos empleando un conjugado tinte-anticuerpo de un anticuerpo CD19 marcado con el tándem APC-Compuesto 12 en comparación al anticuerpo CD19 marcado con Alexa Fluor®.

- 30 La Figura 12 muestra la comparación de luminiscencia del tándem del Compuesto 12 (R700), y los conjugados con CD8 directo, frente APC, y los conjugados APC-H7. El conjugado del tándem APC-R700 es más brillante que el de los conjugados con R700 directo, y los conjugados del tinte tradicional.

La Figura 13 muestra que el tándem del Compuesto 12 (R700) tiene menos % de consecuencias indirectas en los conjugados de APC y APC-Cy7, y PerCP-Cy5,5 que un tinte Alexa 700.

**Definiciones**

- 35 Los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique de otra manera. Cualquiera de los términos sin definir tienen sus significados reconocidos en la técnica.

40 “Alquilo” se refiere a los grupos hidrocarburo alifáticos saturados monovalentes que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, tal como de 1 a 6 átomos, o 1 a 4, o 1 a 3 átomos de carbono. Este término incluye, a modo de ejemplo, grupos hidrocarburo lineales y ramificados, tales como metilo (CH<sub>3</sub>-), etilo (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-), n-propilo (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), isopropilo ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-), n-butilo (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), isobutilo ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-), sec-butilo ((CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)CH-), t-butilo ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-), n-pentilo (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), y neopentilo ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>-).

45 El término “alquilo sustituido” se refiere a un grupo alquilo, como se define en la presente memoria, en donde uno o más átomos de carbono en la cadena alquilo se han reemplazado opcionalmente con un heteroátomo, tal como -O-, -N-, -S-, S(O)<sub>n</sub>- (donde n es de 0 a 2), -NR- (donde R es hidrógeno o alquilo) y que tiene de 1 a 5 sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxilo, amino, aminoacilo, aminoaciloxilo, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tiocetona, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxilo, tiorheteroariloxilo, tiorheterociclooxilo, tiol, tialcoxilo, tialcoxilo sustituido, arilo, ariloxilo, heteroarilo, heteroariloxilo, heterociclilo, heterociclooxilo, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-arilo, -SO<sub>2</sub>-heteroarilo, y -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, en donde R<sup>y</sup> R<sup>z</sup> pueden ser iguales o diferentes y se eligen a partir del hidrógeno, sustituido opcionalmente por alquilo, cicloalquilo, alquenilo, cicloalquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterociclo.

- “Alquilenos” se refiere a grupos hidrocarburo alifáticos que tienen preferiblemente de 1 a 6, y más preferiblemente, de 1 a 3 átomos de carbono, que están o bien ramificados o bien encadenados inmediatamente, y que se interrumpen opcionalmente con uno o más grupos que se seleccionan de -O-, -NR<sup>10</sup>-, -NR<sup>10</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>10</sup>- y similares. Estos términos incluyen, a modo de ejemplo, metileno (-CH<sub>2</sub>-), etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), n-propileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), isopropileno (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-), (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-), (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-), (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-), y similares.
- 5 “Alquilenos sustituidos” se refiere a un grupo alquilenos que tiene de 1 a 3 hidrógenos reemplazados con sustituyentes, como se describen para los carbonos en la definición de “sustituido” de abajo.
- El término “alcano” se refiere al grupo alquilo y al grupo alquilenos, como se definen en la presente memoria.
- 10 El término “alquilaminoalquilo”, “alquilaminoalquilenos” y “alquilaminoalquilenos” se refieren a los grupos R'NHR''- donde R' es un grupo alquilo como se define en la presente memoria, y R'' es un grupo alquilenos, alquilenos o alquilenos, como se define en la presente memoria.
- El término “alcarilo” o “aralquilo” se refiere a los grupos aril-alquilenos- y -aril-alquilenos sustituido, donde el alquilenos, alquilenos sustituido y arilo, son como se define en la presente memoria.
- 15 “Alcoxilo” se refiere al grupo -O-alquilo, en donde el alquilo es como se define en la presente memoria. El alcoxilo incluye, a modo de ejemplo, metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, isopropoxilo, n-butoxilo, t-butoxilo, sec-butoxilo, n-pentoxilo, y similares. El término “alcoxilo” se refiere también a los grupos -O-alquilenos, -O-cicloalquilo, -O-cicloalquilenos, y -O-alquilenos, donde alquilenos, cicloalquilo, cicloalquilenos, y alquilenos, son como se define en la presente memoria.
- 20 El término “alcoxilo sustituido” se refiere a los grupos -O-alquilo sustituido, -O-alquilenos sustituido, -O-cicloalquilo sustituido, -O-cicloalquilenos sustituido, y -O-alquilenos sustituido, donde el alquilo sustituido, alquilenos sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquilenos sustituido y alquilenos sustituido, son como se define en la presente memoria.
- El término “alcoxiamino” se refiere al grupo -NH-alcoxilo, en donde el alcoxilo es como se define en la presente memoria.
- 25 El término “haloalcoxilo” se refiere a los grupos -O-alquilo en donde uno o más átomos de hidrógeno en el grupo alquilo se han sustituido por un grupo halógeno e incluye, a modo de ejemplo, grupos tales como trifluorometoxilo, y similares.
- El término “haloalquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido como se describe anteriormente, en donde uno o más átomos de hidrógeno se han sustituido por un grupo halógeno. Ejemplos de tales grupos incluyen, sin limitación,
- 30 grupos fluoroalquilo, tales como trifluorometilo, difluorometilo, trifluoroetilo y similares.
- El término “alquilalcoxilo” se refiere a los grupos -alquilenos-O-alquilo, alquilenos-O-alquilo sustituido, alquilenos sustituido-O-alquilo, y alquilenos sustituido-O-alquilo sustituido, en donde el alquilo, el alquilo sustituido, el alquilenos y el alquilenos sustituido, son como se define en la presente memoria.
- El término “alquiltioalcoxilo” se refiere al grupo -alquilenos-S-alquilo, alquilenos-S-alquilo sustituido, alquilenos sustituido-S-alquilo y alquilenos sustituido-S-alquilo sustituido, en donde alquilo, alquilo sustituido, alquilenos y alquilenos sustituido, son como se define en la presente memoria.
- 35 “Alquilenos” se refiere a los grupos hidrocarburo ramificados o de cadena lineal que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, y preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono, y que tienen al menos 1, y preferiblemente de 1 a 2 sitios de insaturación de doble enlace. Este término incluye, a modo de ejemplo, bi-vinilo, alilo, y but-3-en-1-il. Están incluidos dentro de este término los isómeros cis y trans o las mezclas de estos isómeros.
- 40 El término “alquilenos sustituido” se refiere a un grupo alquilenos, como se define en la presente memoria, que tiene de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, que se seleccionan de alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilenos, cicloalquilenos sustituido, acilo, acilamino, aciloxilo, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxilo, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tiocetona, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxilo, tioheteroariloxilo, tioheterocicloalquilo, tiol, tioalcoxilo, tioalcoxilo sustituido, arilo, ariloxilo, heteroarilo, heteroariloxilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo y -SO<sub>2</sub>-heteroarilo.
- 45 “Alquilenos” se refiere a grupos hidrocarburo monovalente lineales o ramificados que tienen de 2 a 6 átomos de carbono, y preferiblemente de 2 a 3 átomos de carbono, y que tienen al menos 1, y preferiblemente de 1 a 2 sitios de insaturación de triple enlace. Ejemplos de tales grupos alquilenos incluyen acetilenos (-C≡CH), y propargilos (-CH<sub>2</sub>C≡CH).
- 50 El término “alquilenos sustituido” se refiere a un grupo alquilenos como se define en la presente memoria, que tiene de 1 a 5 sustituyentes, que se seleccionan de alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilenos, cicloalquilenos sustituido, acilo, acilamino, aciloxilo, amino, amino sustituido, aminoacilo,

aminoaciloxilo, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tiocetona, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxilo, tioheterocicloxiolo, tiol, tioalcoxilo, tioalcoxilo sustituido, arilo, ariloxilo, heteroarilo, heteroariloxilo, heterociclilo, heterocicloxiolo, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo y -SO<sub>2</sub>-heteroarilo.

- 5 “Alquiloxilo” se refiere al grupo -O-alquilo, en donde el alquilo es como se define en la presente memoria. Alquiloxilo incluye, a modo de ejemplo, etiniloxilo, propiniloxilo, y similares.

10 “Acilo” se refiere a los grupos H-C(O)-, alquilo-C(O), alquilo-C(O) sustituido, alqueno-C(O)-, alqueno-C(O)-sustituido, alquino-C(O)-, alquino-C(O)-sustituido, cicloalquilo-C(O)-, cicloalquilo-C(O)-sustituido, cicloalqueno-C(O)-, cicloalqueno-C(O)-sustituido, arilo-C(O)-, arilo-C(O)-sustituido, heteroarilo-C(O)-, heteroarilo-C(O)-sustituido, heterociclilo-C(O)-, y heterociclilo-C(O)-sustituido, en donde el alquilo, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido son como se define en la presente memoria. Por ejemplo, acilo incluye el grupo “acetilo” CH<sub>3</sub>C(O)-.

15 “Acilamino” se refiere a los grupos -NR<sup>20</sup>C(O)alquilo, -NR<sup>20</sup>C(O)alquilo sustituido, -NR<sup>20</sup>C(O)cicloalquilo, -NR<sup>20</sup>C(O)cicloalquilo sustituido, -NR<sup>20</sup>C(O)cicloalqueno, -NR<sup>20</sup>C(O)cicloalqueno sustituido, -NR<sup>20</sup>C(O)alqueno, -NR<sup>20</sup>C(O)alqueno sustituido, -NR<sup>20</sup>C(O)alquino, -NR<sup>20</sup>C(O)alquino sustituido, -NR<sup>20</sup>C(O)arilo, -NR<sup>20</sup>C(O)arilo sustituido, -NR<sup>20</sup>C(O)heteroarilo, -NR<sup>20</sup>C(O)heteroarilo sustituido, -NR<sup>20</sup>C(O)heterociclilo, -NR<sup>20</sup>C(O)heterociclilo sustituido, en donde R<sup>20</sup> es hidrógeno o alquilo, y en donde el alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido son como se define en la presente memoria.

20 “Aminocarbonilo” o el término “aminoacilo” se refiere al grupo -C(O)NR<sup>21</sup>R<sup>22</sup>, en donde R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, y en donde R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> se unen opcionalmente ejunto con el enlace de nitrógeno para formar un grupo heterociclilo o heterociclilo sustituido, y en donde el alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, son como se define en la presente memoria.

25 “Aminocarbonilamino” se refiere al grupo -NR<sup>21</sup>C(O)NR<sup>22</sup>R<sup>23</sup> en donde R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup>, y R<sup>23</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, arilo o cicloalquilo, o donde dos grupos R se unen para formar un grupo heterociclilo.

30 El término “alcoxicarbonilamino” se refiere al grupo -NRC(O)OR donde cada R es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, o heterociclilo, en donde el alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, y heterociclilo son como se define en la presente memoria.

35 El término “aciloxilo” se refiere a los grupos alquilo-C(O)O-, alquilo-C(O)O- sustituido, cicloalquilo-C(O)O-, cicloalquilo-C(O)O- sustituido, arilo-C(O)O-, heteroarilo-C(O)O-, y heterociclilo-C(O)O- sustituido, en donde el alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, heteroarilo, y heterociclilo son como se define en la presente memoria.

40 “Aminosulfonilo” se refiere al grupo -SO<sub>2</sub>NR<sup>21</sup>R<sup>22</sup>, en donde R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, y en donde R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> se unen opcionalmente junto con el enlace de nitrógeno para formar un grupo heterociclilo o heterociclilo sustituido, y en donde el alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, son como se define en la presente memoria.

45 “Sulfonilamino” se refiere al grupo -NR<sup>21</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>22</sup>, en donde R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, y en donde el R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> se unen opcionalmente junto con átomos unidos a ello para formar un grupo heterociclilo o heterociclilo sustituido, y en donde el alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, son como se define en la presente memoria.

50 “Arilo” o “Ar” se refiere a un grupo carbocíclico aromático de 6 a 18 átomos de carbono que tiene un solo anillo (tal como se presenta en un grupo fenilo) o un sistema de anillos que tiene múltiples anillos condensados (ejemplos de tales sistemas de anillos aromáticos incluyen naftilo, antrilo e indanilo) cuyos anillos condensados pueden ser o no

- aromáticos, siempre y cuando el punto de unión sea a través de un átomo o un anillo aromático. Este término incluye, a modo de ejemplo, fenilo, y naftilo. A menos que se limite de otra manera mediante la definición para el sustituyente arilo, tales grupos arilo se pueden sustituir opcionalmente con de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, que se seleccionan de aciloxilo, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquinilo, cicloalquenilo, alquilo sustituido, alcoxilo sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxilo, azido, carboxilo, carboxialquilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxilo, heterociclilo, heterocicloxi, aminoaciloxilo, oxiacilamino, tioalcoxilo, tioalcoxilo sustituido, tioariloxilo, tioheteroariloxilo, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo, -SO<sub>2</sub>-heteroarilo y trihalometilo.
- 5 “Amino” se refiere al grupo -NH<sub>2</sub>.
- 10 El término “amino sustituido” se refiere al grupo -NRR donde cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, heteroarilo, y heterociclilo, y el heterociclilo proporciona que al menos un R no sea hidrógeno.
- 15 El término “azido” se refiere al grupo -N<sub>3</sub>.
- “Carboxilo”, “carboxi” o “carboxilato” se refiere a -CO<sub>2</sub>H o sales de los mismos.
- 20 “Éster de carboxilo” o “carboxiestér” o el término “carboxialquilo” se refiere a los grupos -C(O)O-alquilo, -C(O)O-alquilo sustituido, -C(O)O-alquenilo, -C(O)O-alquenilo sustituido, -C(O)O-alquinilo, -C(O)O-alquinilo sustituido, -C(O)O-arilo, -C(O)O-arilo sustituido, -C(O)O-cicloalquinilo, -C(O)O-cicloalquinilo sustituido, -C(O)O-cicloalquenilo, -C(O)O-cicloalquenilo sustituido, -C(O)O-heteroarilo, -C(O)O-heteroarilo sustituido, -C(O)O-heterociclilo, -C(O)O-heterociclilo sustituido, en donde el alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, son como se define en la presente memoria.
- 25 “Oxi(éster de carboxilo)” o “carbonato” se refiere a los grupos -O-C(O)O-alquilo, -O-C(O)O-alquilo sustituido, -O-C(O)O-alquenilo, -O-C(O)O-alquenilo sustituido, -O-C(O)O-alquinilo, -O-C(O)O-alquinilo sustituido, -O-C(O)O-arilo, -O-C(O)O-arilo sustituido, -O-C(O)O-cicloalquilo, -O-C(O)O-cicloalquilo sustituido, -O-C(O)O-cicloalquenilo, -O-C(O)O-cicloalquenilo sustituido, -O-C(O)O-heteroarilo, -O-C(O)O-heteroarilo sustituido, -O-C(O)O-heterociclilo, y -O-C(O)O-heterociclilo sustituido, en donde el alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heterociclilo, y heterociclilo sustituido, son como se define en la presente memoria.
- 30 “Ciano” o nitrilo” se refiere al grupo -CN.
- 35 “Cicloalquilo” se refiere a los grupos de alquilo cíclicos de 3 a 10 átomos de carbono que tienen un solo anillo o anillos múltiples, que incluyen sistemas de anillos fusionados, unidos y spiro. Ejemplos de grupos cicloalquilo adecuados incluyen, por ejemplo, adamantilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo, y similares. Tales grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de un solo anillo, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo, y similares, o estructuras de anillo múltiple, tal como adamantilo, y similares.
- 40 El término “cicloalquilo sustituido” se refiere a grupos cicloalquilo que tienen de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, que se seleccionan de alquilo, alquilo sustituido, alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxilo, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxilo, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tiocetona, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxilo, tioheteroariloxilo, tioheterocicloxi, tiol, tioalcoxilo, tioalcoxilo sustituido, arilo, ariloxilo, heteroarilo, heteroariloxilo, heterociclilo, heterocicloxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo y -SO<sub>2</sub>-heteroarilo.
- 45 “Cicloalquenilo” se refiere a grupos alquilo cíclicos no aromáticos de 3 a 10 átomos de carbono que tienen un anillo o anillos múltiples, y que tienen al menos un enlace doble y, preferiblemente de 1 a 2 enlaces dobles.
- 50 El término “cicloalquenilo sustituido” se refiere a grupos cicloalquenilo que tienen de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, que se seleccionan del alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxilo, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxilo, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, cetona, tiocetona, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxilo, tioheteroariloxilo, tioheterocicloxi, tiol, tioalcoxilo, tioalcoxilo sustituido, arilo, ariloxilo, heteroarilo, heteroariloxilo, heterociclilo, heterocicloxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo y -SO<sub>2</sub>-heteroarilo.
- 55

“Cicloalquinilo” se refiere a grupos cicloalquilo no aromáticos de 5 a 10 átomos de carbono que tienen un anillo o anillos múltiples, y que tienen al menos un enlace triple.

“Cicloalcoxilo” se refiere a –O-cicloalquilo.

“Cicloalqueniloxilo” se refiere a –O-cicloalquenilo.

5 “Halo” o “halógeno” se refiere a flúor, cloro, bromo, y yodo.

“Hidroxi” o “hidroxilo” se refiere al grupo –OH.

“Heteroarilo” se refiere a un grupo aromático de 1 a 15 átomos de carbono, tal como de 1 a 10 átomos de carbono, y de 1 a 10 heteroátomos que se seleccionan del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, y azufre dentro del anillo. Tales grupos heteroarilo pueden tener un solo anillo (tal como, piridinilo, imidazolilo, o furilo) o anillos múltiples condensados en un sistema de anillo (por ejemplo, como en grupos tales como, indolizínilo, quinolinilo, benzofurano, benzimidazolilo o benzotienilo), en donde al menos un anillo dentro del sistema del anillo es aromático, y al menos un anillo dentro del sistema de anillo es aromático, siempre y cuando el punto de unión sea a través de un átomo de un anillo aromático. En determinadas realizaciones, el nitrógeno y/o átomo u átomos de azufre del grupo heteroarilo se oxidan opcionalmente para proporcionar el N-óxido (N→O), sulfínilo, o restos sulfonilo. Este término incluye, a modo de ejemplo, piridinilo, pirrolilo, indolilo, tiofenilo, y furanilo. A menos que se limite de otra manera mediante la definición para el sustituyente heteroarilo, tales grupos heteroarilo se pueden sustituir opcionalmente con de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, que se seleccionan del aciloxilo, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo sustituido, alcoxilo sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxilo, azido, carboxilo, carboxialquilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, aminoaciloxilo, oxiacilamino, tioalcoxilo, tioalcoxilo sustituido, tioariloxilo, tioheteroariloxilo, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo y -SO<sub>2</sub>-heteroarilo, y trihalometilo.

En determinadas realizaciones, cualquier sistema de anillo arilo o heteroarilo se puede no sustituir, u opcional e independientemente sustituirse por cualquier combinación de sustituyentes accesible sintéticamente y estable químicamente, tal como H, halógeno, ciano, sulfo, sal de azufre de amonio o álcali, nitro, carboxilo, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxilo, alquiltio, amino, monoalquilamino, dialquilamino o alquilamido, cuyas porciones alquilo tienen 18 carbonos o menos.

El término “heteroaralquilo” se refiere a los grupos –alquileo-heteroarilo donde el alquileo y el heteroarilo son como se define en la presente memoria. Este término incluye, a modo de ejemplo, piridilmetilo, piridiletilo, indolilmetilo, y similares.

“Heteroariloxilo” se refiere a –O-heteroarilo.

El término “heteroátomo”, como se emplea en la presente memoria, por sí mismo o como parte de otro grupo, significa un átomo de oxígeno (“O”), un átomo de azufre (“S”) o un átomo de nitrógeno (“N”). Se aceptará que cuando el heteroátomo sea nitrógeno, podrá formar un resto NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son, independientemente uno del otro, hidrógeno o alquilo, o junto con nitrógeno al cual se unen, forman un anillo saturado o insaturado de 5-, 6-, o 7-miembros.

“Heterociclo”, “heterocíclico”, “heterocicloalquilo”, y “heterociclilo” se refiere a un grupo saturado o insaturado que tiene un solo anillo o anillos múltiples condensados, que incluyen sistemas de anillo fusionados por un puente y espiro, y que tienen de 3 a 20 átomos en el anillo (tal como de 5 a 14 átomos en el anillo), que incluyen de 1 a 10 heteroátomos (tal como 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos de oxígeno, nitrógeno o azufre). Estos átomos del anillo se seleccionan del grupo que consiste en nitrógeno, azufre, u oxígeno, en donde, en sistemas de anillo fusionados, uno o más de los anillos pueden ser cicloalquilo, arilo, o heteroarilo, siempre y cuando la unión sea a través del anillo no aromático. En determinadas realizaciones, el átomo o átomos de nitrógeno y/o azufre del grupo heterocíclico, se oxidan opcionalmente para proporcionar el N-óxido, -S(O)-, o restos–SO<sub>2</sub>-.

Ejemplos de heterociclos y heteroarilos incluyen, pero no se limitan a, azetidina, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, dihidroindol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, fenoxazina, fenotiazina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, ftalimida, 1, 2, 3, 4-tetrahidroisoquinolina, 4, 5, 6, 7-tetrahidrobenzo [b]tiofeno, tiazol, tiazolidina, tiofeno, benzo [b]tiofeno, morfolinilo, tiomorfolinilo (también referido como tiamorfolinilo), 1,1-dioxotiomorfolinilo, piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofurano, y similares.

Ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen los grupos tienilo, benzo[b]tienilo, nafto[2,3-b]tienilo, tiantrenilo, furilo, piranilo, isobenzofuranilo, benzoxazolilo, chromenilo, xantenilo, fenoxatiinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolilo, indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, isoquinolilo, quinolilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinazolínilo, cinnolinilo, pteridinilo, carbazolilo,

fenantridinilo, acridinilo, perimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, isotiazolilo, fenotiazinilo, isoxazolilo, furazanilo, fenoxazinilo, y tetrazolilo.

A menos que se limite de otra manera mediante la definición para el sustituyente heterocíclico, tales grupos heterocíclicos se pueden sustituir opcionalmente con de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, que se seleccionan de alcoxilo, alcoxilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, acilo, acilamino, aciloxilo, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxilo, oxiaminoacilo, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tiocetona, carboxilo, carboxialquilo, tioariloxilo, tiorheteroariloxilo, tiorheterocicloxiolo, tiol, tioalcoxilo, tioalcoxilo sustituido, arilo, ariloxilo, heteroarilo, heteroariloxilo, heterociclilo, heterocicloxiolo, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo, -SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, -SO<sub>2</sub>-arilo, -SO<sub>2</sub>-heteroarilo y heterociclo fusionado.

“Heterociciloxilo” se refiere al grupo -O-heterociclilo.

El término “heterocicilitio” se refiere al grupo heterocíclico -S-.

El término “heterociclono” se refiere al grupo dirradical formado de un heterociclo, como se define en la presente memoria.

15 El término “hidroxiamino” se refiere al grupo -NHOH.

“Nitro” se refiere al grupo al grupo -NO<sub>2</sub>.

“Oxo” se refiere al átomo (=O).

20 “Sulfonilo” se refiere al grupo SO<sub>2</sub>-alquilo, SO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, SO<sub>2</sub>-alquenilo, SO<sub>2</sub>-alquenilo sustituido, SO<sub>2</sub>-cicloalquilo, SO<sub>2</sub>-cicloalquilo sustituido, SO<sub>2</sub>-cicloalquenilo, SO<sub>2</sub>-cicloalquenilo sustituido, SO<sub>2</sub>-arilo, SO<sub>2</sub>-arilo sustituido, SO<sub>2</sub>-heteroarilo, SO<sub>2</sub>-heteroarilo sustituido, SO<sub>2</sub>-heterocíclico, SO<sub>2</sub>-heterocíclico sustituido, en donde el alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, y heterociclo sustituido, son como se define en la presente memoria. Los sulfonilos incluyen, a modo de ejemplo, metilo-SO<sub>2</sub>-, fenilo-SO<sub>2</sub>-, y 4-metilfenilo-SO<sub>2</sub>-.

25 “Sulfoniloxilo” se refiere al grupo -OSO<sub>2</sub>-alquilo, OSO<sub>2</sub>-alquilo sustituido, OSO<sub>2</sub>-alquenilo, OSO<sub>2</sub>-alquenilo sustituido, OSO<sub>2</sub>-cicloalquilo, OSO<sub>2</sub>-cicloalquilo sustituido, OSO<sub>2</sub>-cicloalquenilo, OSO<sub>2</sub>-cicloalquenilo sustituido, OSO<sub>2</sub>-arilo, OSO<sub>2</sub>-arilo sustituido, OSO<sub>2</sub>-heteroarilo, OSO<sub>2</sub>-heteroarilo sustituido, OSO<sub>2</sub>-heterociclo, OSO<sub>2</sub>-heterociclo sustituido, en donde el alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterociclo, y heterociclo sustituido, son como se define en la presente memoria.

30 El término “aminocarboniloxilo” se refiere al grupo -OC(O)NRR donde cada R es independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo, o heterociclo, en donde el alquilo, alquilo sustituido, arilo, heteroarilo y heterociclo, son como se definen en la presente memoria.

“Tiol” se refiere al grupo -SH.

35 “Tioxo” o el término “tioceto” se refiere se refiere al átomo (=S).

“Alquiltilio” o el término “tioalcoxilo” se refiere al grupo -S-alquilo, en donde el alquilo es como se define en la presente memoria. En determinadas realizaciones, al azufre se puede oxidar a -S(O). El sulfóxido puede existir como uno o más estereoisómeros.

El término “tioalcoxilo sustituido” se refiere al grupo -S-alquilo sustituido.

40 El término “tioariloxilo” se refiere al grupo arilo-S- en donde el grupo arilo es como se define en la presente memoria, incluyendo opcionalmente grupos arilo sustituidos que se definen también en la presente memoria.

El término “tiorheteroariloxilo” se refiere al grupo heteroarilo-S- en donde el grupo heteroarilo es como se define en la presente memoria, incluyendo opcionalmente grupos arilo sustituidos como se definen también en la presente memoria.

45 El término “tiorheterocicloxiolo” se refiere al grupo heterociclilo-S- en donde el grupo heterociclilo es como se define en la presente memoria, incluyendo opcionalmente grupos heterociclilo sustituidos como se definen también en la presente memoria.

50 Además de la divulgación en la presente memoria, el término “sustituido”, cuando se emplea para modificar un grupo o radical específico, puede significar también que uno o más átomos de hidrógeno del grupo o radical específico son cada uno, independientemente del otro, reemplazados por el mismo o diferente grupo de sustituyentes, como se define más abajo.

Además de los grupos descritos respecto a los términos individuales de la presente memoria, los grupos sustituyentes para sustituir uno o más hidrógenos (cualquiera de los dos hidrógenos en un solo carbono se puede reemplazar por =O, =NR<sup>70</sup>, =N-OR<sup>70</sup>, =N<sub>2</sub> o =S) en los átomos de carbono saturados en el grupo o radical específico son, a menos que se especifique de otra manera, -R<sup>60</sup>, halógeno, =O, -OR<sup>70</sup>, -SR<sup>70</sup>, -NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, trihalometilo, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -SO<sub>2</sub>O

M<sup>+</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -OSO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -OSO<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OSO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -P(O)(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>70</sup>, -C(S)R<sup>70</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>, -C(O)O<sup>-</sup>

M<sup>+</sup>, -C(O)OR<sup>70</sup>, -C(S)OR<sup>70</sup>, -C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -OC(O)R<sup>70</sup>, -OC(S)R<sup>70</sup>, -OC(O)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OC(O)OR<sup>70</sup>, -OC(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>

- 10 M<sup>+</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup> y -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, donde R<sup>60</sup> se selecciona del grupo que consiste en un alquilo, cicloalquilo, heteroalquilo, heterocicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, y heteroarilalquilo opcionalmente sustituido, cada R<sup>70</sup> es independientemente hidrógeno o R<sup>60</sup>; cada R<sup>80</sup> es independientemente R<sup>70</sup> o alternativamente, dos R<sup>80</sup>s, tomados junto con el átomo de nitrógeno al cual se unen, forman un heterocicloalquilo de 5-, 6- ó 7- miembros que puede incluir opcionalmente de 1 a 4 heteroátomos adicionales iguales o diferentes, que se seleccionan del grupo que consiste en O, N y S, de los cuales N puede tener -H o una sustitución de C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alquilo; y cada M<sup>+</sup> es un contraión con una sola carga positiva neta. Cada M<sup>+</sup> puede ser independientemente, por ejemplo, un ión alcalino, tal como K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>; un ión amonio, tal como <sup>+</sup>N(R<sup>60</sup>)<sub>4</sub>; o un ión alcalinotérreo, tal como [Ca<sup>2+</sup>]<sub>0,5</sub>, [Mg<sup>2+</sup>]<sub>0,5</sub>, o [Ba<sup>2+</sup>]<sub>0,5</sub>, ("el subíndice 0,5 significa que uno de los iones contrarios para tales iones alcalinotérreos, tal como cloruro, o dos compuestos ionizados descritos en la presente memoria, pueden servir como iones que contrarrestan cada ión alcalinotérreo divalente, o que un compuesto de la invención doblemente ionizado puede servir como el ión contrario para cada ión divalente alcalinotérreo). Como ejemplos específicos, -NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup> incluye -NH<sub>2</sub>, -NH-alquilo, *N*-pirrolidinilo, *N*-piperazinilo, 4*N*-metil-piperazin-1-il y *N*-morfolinilo.

- 25 Además de la divulgación de la presente memoria, los grupos sustituyentes para los hidrógenos en los átomos de carbono insaturados en los grupos alqueno, alquino, arilo y heteroarilo "sustituidos" son, a menos que se especifique de otra manera, -R<sup>60</sup>, halógeno, -O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OR<sup>70</sup>, -SR<sup>70</sup>, -S<sup>+</sup>M<sup>+</sup>, -NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>,

- 30 trihalometilo, -CF<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, -SO<sub>3</sub>R<sup>70</sup>, -OSO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, -OSO<sub>3</sub>R<sup>70</sup>, -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>70</sup>, -C(S)R<sup>70</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>, -CO<sub>2</sub>M<sup>+</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -C(S)OR<sup>70</sup>, -C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -OC(O)R<sup>70</sup>, -OC(S)R<sup>70</sup>, -OCO<sub>2</sub>M<sup>+</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -OC(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>M<sup>+</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>, y -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, donde R<sup>60</sup>, R<sup>70</sup>, R<sup>80</sup> y M<sup>+</sup> son como se define previamente, a condición de que en el caso del alqueno o del alquino sustituido, los sustituyentes no sean -O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OR<sup>70</sup>, o -S<sup>+</sup>M<sup>+</sup>.

- 35 Además de los grupos descritos con respecto a los términos individuales de la presente memoria, los grupos sustituyentes para los hidrógenos en los átomos de nitrógeno en los grupos heteroalquilo y cicloheteroalquilo "sustituidos" son, a menos que se especifique de otra manera, R<sup>60</sup>, -O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OR<sup>70</sup>, -SR<sup>70</sup> o -S<sup>+</sup>M<sup>+</sup>, NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, trihalometilo, -CF<sub>3</sub>, -CN, -NO, -NO<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -S(O)<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -S(O)<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -P(O)(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)<sub>2</sub>(OR<sup>70</sup>), -C(O)R<sup>70</sup>, -C(S)R<sup>70</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>, -C(O)OR<sup>70</sup>, -C(S)OR<sup>70</sup>, -C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -OC(O)OR<sup>70</sup>, -OC(S)OR<sup>70</sup>, -OC(O)OR<sup>70</sup>, -OC(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>, y -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, donde R<sup>60</sup>, R<sup>70</sup>, R<sup>80</sup> y M<sup>+</sup> son como se define previamente.

Además de la divulgación de la presente memoria, en una determinada divulgación, se sustituye un grupo que tiene 1, 2, 3, ó 4 sustituyentes, 1, 2, ó 3 sustituyentes, 1 ó 2 sustituyentes, o 1 sustituyente.

- 45 En algunas realizaciones, cuando un compuesto, resto químico o grupo funcional se describe como sustituido, el resto sustituyente radical alternativo se selecciona generalmente del grupo que consiste en hidroxilo, oxo, nitro, trifluorometilo, halógeno, alcoxilo, alquilendioxilo, aminoalquilo, aminoalcoxilo, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcocarbonilamino, alcocarbonilo, carboxilo, hidroxialcoxilo, alcocalcoxilo, monoalquilaminoalcoxilo, dialquilaminoalcoxilo(carboxialquilo)amino, bis(carboxialquilo)amino, alcocarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, alquilsulfonamido, carboxialcoxilo, carboxialquilo, carboxialquilamino, ciano, trifluorometoxilo, perfluoroetoxilo, guanidina, amidino, oxiguanidino, alquilimino, formilimino, acilnitrilo, acilazida, acetilazida, diclorotriazeno, isotiocianato, haluro de sulfonilo, éster de sulfosuccinimidilo, isocianato, haluro de acilo, halogenoacetamida, maleimido, aziridinilo, alquiltio (disulfuro), acrililo, halogenoalquilcarbonilo, boronato, hidrazida, semicarbazida, carbohidrazida, arilalquilo, heteroarilalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquenilalquilo, cicloheteroalquilalquilo, y cicloheteroalquenilalquilo.

- 55 Se entenderá que en todos los grupos sustituidos definidos anteriormente, los polímeros que alcanzan a definir los sustituyentes con otros sustituyentes aparte de ellos mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido como un sustituyente que se sustituye a sí mismo con un grupo arilo sustituido, que está sustituido además por un grupo arilo sustituido, etc.) no se incluyen en la presente memoria. En tales casos, el número

máximo de tales sustituciones es de tres. Por ejemplo, una serie de sustituciones de grupos arilo que se contemplan específicamente en la presente memoria se limitan al arilo sustituido-(arilo sustituido) por un arilo sustituido.

5 A menos que se indique de otra manera, la nomenclatura de los sustituyentes que no se definen explícitamente en la presente memoria se consigue nombrando la porción terminal de la función seguido de la función adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, el sustituyente "arilalquiloxicarbonilo" se refiere al grupo (arilo)-(alquilo)-O-C(O)-.

En cualquiera de los grupos descritos en la presente memoria que contienen uno o más sustituyentes, se entiende, por supuesto, que tales grupos no contienen ninguna sustitución o patrones de sustitución que no sean estéricamente inviable y/o sintéticamente no factibles. Además, los compuestos de la invención incluyen todos los isómeros estereoquímicos procedentes de la sustitución de estos compuestos.

10 El término "sal aceptable farmacéuticamente" significa una sal que es aceptable para la administración a un paciente, tal como un mamífero (sales con contraiones que tienen una seguridad aceptable en mamíferos para un régimen de dosificación dado). Tales sales se pueden derivar de bases orgánicas o inorgánicas aceptables farmacéuticamente y de ácidos orgánicos o inorgánicos aceptables farmacéuticamente. "Sal aceptable farmacéuticamente" se refiere a sales de un compuesto aceptable farmacéuticamente, cuyas sales se derivan de  
15 una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica e incluyen, sólo a modo de ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares; y cuando la molécula contiene una función básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, tal como hidrocioruro, hidrobromuro, formiato, tartrato, besilato, mesilato, acetato, maleato, oxalato, y similares.

20 El término "sal del mismo" significa un compuesto formado cuando se reemplaza un protón de un ácido por un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico, y similares. Cuando se aplica, la sal es una sal aceptable farmacéuticamente, aunque no se requiere para sales de compuestos intermedios que no se destinen a la administración a un paciente. A modo de ejemplo, las sales de los compuestos presentes incluyen aquellos en donde el compuesto se protona mediante un ácido orgánico o inorgánico para formar un catión, con la base conjugada del ácido orgánico o inorgánico como el componente aniónico de la sal.

25 "Solvato" se refiere a un complejo formado mediante combinación de moléculas de disolvente con moléculas o iones del soluto. El disolvente puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico, o una mezcla de ambos. Algunos ejemplos de disolventes incluyen, pero no se limitan a, metanol, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido, y agua. Cuando el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato.

30 "Estereoisómero" y "estereoisómeros" se refiere a los compuestos que tienen la misma conectividad atómica pero diferente disposición en el espacio. Los estereoisómeros incluyen los isómeros *cis-trans*, isómeros *E* y *Z*, enantiómeros, y diastereómeros.

35 "Tautómero" se refiere a las formas alternas de una molécula que difieren sólo en la unión electrónica de los átomos y/o en la posición de un protón, tal como los tautómeros ceto-enol e imina-enamina, o las formas tautoméricas de grupos heteroarilo que contienen un  $-N=C(H)-NH$ -fijación al átomo del anillo, tal como pirazoles, imidazoles, benzimidazoles, triazoles, y tetrazoles.

Se apreciará que el término "o una sal o solvato o estereoisómero del mismo" está destinado a incluir todas las permutaciones de las sales, solvatos y estereoisómeros, tales como un solvato de una sal aceptable farmacéuticamente de un compuesto estereoisómero de la invención.

40 Como se emplea en la presente memoria, el término "biopolímero" se emplea genéricamente para referirse a polímeros aminoácidos, polímeros de ácidos nucleicos, carbohidratos, polisacáridos, y lípidos, cada una se define ampliamente en la presente memoria.

45 Los términos "polímero aminoácido", "polipéptido", "péptido", y "proteína" se emplean de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas que se han sometido a modificación co-traducciona l o post-traducciona l, tal como las glicoproteínas. El polímero aminoácido puede comprender tanto aminoácidos estándar (es decir, uno de los 20 aminoácidos se codifican por el código genético estándar, también referido como proteinogénico) como aminoácidos no estándar, se pueden derivar, proteger, o sustituir, tal como, por ejemplo, mediante fosfatos, carbohidratos, o ácidos carboxílicos  $C_1$  a  $C_{25}$ . Los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se emplean en la presente memoria de forma intercambiable sin distinción en cuanto a la longitud del polímero, aunque los aminoácidos cortos se refieren normalmente como péptidos o polipéptidos y los polímeros de aminoácidos largos, particularmente los de aquellos que aparece naturalmente y/o que tienen una función biológica, son referidos como proteínas. El término incluye proteínas de fusión, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión con una secuencia aminoácida heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, las cuales contienen al menos un resto N-terminal de metionina (por ejemplo, para facilitar la producción en una célula huésped bacteriana recombinante); proteínas marcadas  
55 inmunológicamente; y similares.

"Secuencia aminoácida nativa" o "secuencia aminoácida matriz" se emplean de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a la secuencia aminoácida de un polipéptido anterior a la modificación para incluir un resto

aminoácido modificado.

Los términos “aminoácido análogo”, “aminoácido no natural”, y similares, se pueden emplear de forma intercambiable, e incluye compuestos similares a aminoácidos que son similares en estructura y/o forma general para uno o más aminoácidos que se encuentran normalmente en proteínas que aparecen de forma natural (por ejemplo, Ala o A, Cys o C, Asp o D, Glu o E, Phe o F, Gly o G, His o H, Ile o I, Lys o K, Leu o L, Met o M, Asn o N, Pro o P, Gln o Q, Arg o R, Ser o S, Thr o T, Val o V, Trp o W, Tyr o Y). Los aminoácidos análogos incluyen también aminoácidos naturales con cadenas laterales o ejes centrales modificados. Los aminoácidos incluyen también a los aminoácidos que aparecen en forma D- de forma natural, más que en forma L-. En algunos ejemplos, los aminoácidos análogos comparten estructuras del eje central, y/o estructuras de cadenas laterales de uno o más aminoácidos, con diferencias en uno o más grupos modificados en la molécula. Tal modificación puede incluir, pero limitarse a, sustitución de un átomo (tal como N) por un átomo relacionado (tal como S), adición de un grupo (tal como metilo, o hidroxilo, etc.) o un átomo (tal como Cl o Br, etc.), eliminación de un grupo, sustitución de un enlace covalente (enlace simple por enlace doble, etc.), o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, aminoácidos análogos pueden incluir  $\alpha$ -hidroxiácidos, y  $\alpha$ -aminoácidos, y similares.

Como se emplea en la presente memoria, el término “anticuerpo” incluye todos los productos, derivados o derivables de anticuerpos o genes de anticuerpo, que son útiles como reactivos de unión específicos de la diana. El término “anticuerpo” se emplea en el sentido más amplio e incluye anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de ingeniería genética, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena monocatenarios, anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmentos Fab), derivados de anticuerpos y similares. Un anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno diana. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Schlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana puede tener uno o más sitios de unión, también llamados epítomos, reconocidos por regiones determinantes de complementariedad (CDRs, de sus siglas en inglés) formadas por una o más regiones variables de un anticuerpo.

El término “anticuerpo natural” se refiere a un anticuerpo en el cual las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se han conseguido y apareado mediante el sistema inmune de un organismo multi-celular. Ejemplos de tejidos que producen anticuerpos naturales son el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea y la sangre. Por ejemplo, son anticuerpos naturales los anticuerpos que se producen por el anticuerpo que produce células aisladas a partir de un primer animal inmunizado con un antígeno. El término “anticuerpo humanizado” o “inmunoglobulina humanizada” se refiere a un anticuerpo no-humano (por ejemplo, ratón o conejo) que contiene uno más aminoácidos (en una región estructural, una región constante o un CDR, por ejemplo) que se ha sustituido por un aminoácido posicionado correspondientemente a partir de un anticuerpo humano. En general, los anticuerpos humanizados producen una respuesta inmune reducida en un huésped humano, en comparación con la versión no humanizada del mismo anticuerpo. Los anticuerpos se pueden humanizar empleando una variedad de técnicas bien conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Pat. E.E.U.U. Nos 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o reposición (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994)), y cadena lenta (Patente de E.E.U.U. N° 5.565.332). En determinadas realizaciones, las sustituciones estructurales se identifican mediante el modelado de las interacciones del CDR y los restos estructurales para identificar la estructura de restos importantes para la unión del antígeno y la secuencia en comparación con la identificación de restos estructurales inusuales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N° 5.585.089; Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988)). Métodos adicionales contemplados para humanizar anticuerpos que se contemplan en la presente invención se describen en las Patentes de E.E.U.U. N°s 5.750.078; 5.502.167; 5.705.154; 5.770.403; 5.698.417; 5.693.493; 5.558.864; 4.935.496; y 4.816.567, y publicaciones PCT WO 98/45331 y WO 98/45332. En realizaciones particulares, un anticuerpo de un conejo sujeto se puede humanizar según los métodos establecidos en US20040086979 y US20050033031. Por consiguiente, los anticuerpos descritos anteriormente se pueden humanizar empleando métodos que son bien conocidos en la técnica.

El término “anticuerpos quiméricos” se refiere a los anticuerpos cuyos genes de las cadenas ligera y pesada se han construido, normalmente mediante ingeniería genética, a partir de genes de anticuerpos de regiones variables y constantes pertenecientes a distintas especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes humanos, tales como gamma 1 y gamma 3. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico terapéutico es una proteína híbrida compuesta por un dominio de unión al antígeno o variable, a partir de un anticuerpo de ratón y la constante o dominio efector a partir del anticuerpo humano, aunque se pueden emplear dominios de otras especies de mamífero.

Como se emplea en la presente memoria, los términos “polímero de ácido nucleico”, “ácido nucleico”, y “oligonucleótido” se refiere a polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), a polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y a cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido de una base de purina o pirimidina, o una base de purina o pirimidina modificada. No hay distinción entre los términos “ácido nucleico” y “oligonucleótido”, y estos términos se usarán de forma intercambiable. Estos términos se refieren sólo a la estructura primaria de la molécula. Por tanto, estos términos incluyen ADN monocatenario y bicatenario, así como ARN monocatenario y bicatenario. Los polímeros de ácidos nucleicos pretenden incluir ácidos peptidonucleicos, tal como

unidades de N-(2-aminoetil)glicina (véase Nielsen et al., Patente de E.E.U.U. 5.539.082).

Por “codificable genéticamente” como se emplea en referencia a una secuencia aminoacídica de polipéptido, péptido o proteína, significa que la secuencia aminoacídica se compone de restos de aminoácido que son capaces de la producción mediante transcripción y traducción de un aminoácido que codifica la secuencia aminoacídica, donde la transcripción y/o traducción puede aparecer en una célula o en un sistema de transcripción/traducción in vitro libre de células.

El término “secuencias control” se refiere a secuencias de ADN que facilitan la expresión de una secuencia que codifica la operabilidad vinculada en un sistema de expresión particular, por ejemplo, una célula mamífera, célula bacteriana, síntesis libre celular, etc. Las secuencias control que son adecuadas para sistemas procariontas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Los sistemas celulares eucarióticos pueden utilizar promotores, señales de poliadenilación, y amplificadores.

Un ácido nucleico está “vinculado a operabilidad” cuando se localiza en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está vinculado a operabilidad al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o amplificador está vinculado a operabilidad a una secuencia que codifica si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está vinculado a operabilidad a una secuencia que codifica si se posiciona para facilitar el inicio de la traducción. Generalmente “vinculado a operabilidad” significa que las secuencias de ADN que están vinculadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas a la estructura de lectura. El vínculo se alcanza por unión o a través de reacciones de amplificación. Se pueden emplear adaptadores o enlazadores oligonucleótidos sintéticos para unir secuencias de acuerdo con la práctica convencional.

El término “casete de expresión” como se emplea en la presente memoria, se refiere a un segmento de ácido nucleico, normalmente ADN, que se puede insertar en un ácido nucleico (por ejemplo, mediante el empleo de sitios de restricción compatibles con la unión en una construcción de interés o mediante recombinación homóloga en una construcción de interés o en el genoma de una célula huésped). En general, el segmento de ácido nucleico comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, y el casete y los sitios de restricción se diseñan para facilitar la inserción del casete en la estructura de lectura adecuada para la transcripción y traducción. La expresión de los casetes pueden comprender también elementos que facilitan la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula huésped. Estos elementos, pueden incluir, pero no se limitan a: un promotor, un promotor mínimo, un amplificador, un elemento de respuesta, una secuencia terminadora, una secuencia de poliadenilación, y similares.

Como se emplea en la presente memoria el término “aislado” pretende describir un compuesto de interés que está en un medio diferente al que aparece el compuesto de forma natural. “Aislado” pretende incluir compuestos que están dentro de las muestras que se enriquecen sustancialmente para el compuesto de interés y/o en el que el compuesto de interés está purificado parcial o sustancialmente.

Como se emplea en la presente memoria, el término “purificado sustancialmente” se refiere a un compuesto que se elimina de su medio natural y al menos el 60% está libre, al menos 75% libre, al menos 80% libre, al menos 85% libre, al menos 90% libre, al menos 95% libre, al menos 98% libre, o más del 98% está libre, a partir de otros componentes con los que se asocia de forma natural.

El término “condiciones fisiológicas” pretende abarcar aquellas condiciones compatibles con las células vivas, por ejemplo, condiciones predominantemente acuosas a una temperatura, pH, salinidad, etc, que son compatibles con células vivas.

Por “reactivo asociado” se entiende una molécula o resto molecular que reacciona específicamente con otro reactivo asociado para producir un producto de reacción. Ejemplos de reactivos asociados incluyen una cisteína o serina o un diseño de sulfatasa y Enzima Generadora de Formilglicina (FGE, de sus siglas en inglés), que reaccionan para formar un producto de reacción de un marcador aldehído convertido que contiene en el diseño una formilglicina (fGly) en lugar de cisteína o serina. Otros ejemplos de reactivos asociados incluyen un aldehído de un resto fGly de un marcador aldehído convertido y un “reactivo asociado a un reactivo aldehído”, que comprende un grupo reactivo aldehído y un resto de interés, y que reacciona para formar un producto de reacción de un polipéptido con un aldehído marcado modificado que tiene el resto de interés conjugado al polipéptido modificado a través de un resto fGly.

“N-terminal” se refiere al resto aminoácido terminal de un polipéptido que tiene un grupo amino libre, cuyo grupo amino en los restos aminoácidos no N-terminales forman parte del eje central covalente del polipéptido.

“C-terminal” se refiere al resto aminoácido terminal de un polipéptido que tiene un grupo carboxilo libre, cuyo grupo carboxilo en los restos aminoácidos no C-terminales forman parte del eje central covalente del polipéptido.

Por “sitio interno” como se emplea en referencia a un polipéptido o una secuencia aminoacídica de un polipéptido significa una región del polipéptido que no es N-terminal o C-terminal.

Antes de que la presente invención se describa aún más, se entenderá que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, como tal puede, por supuesto, variar. Se entenderá también que la terminología que se emplea en la presente memoria es con el propósito de describir sólo realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio abarca dentro de la invención hasta la décima unidad del límite menor, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera, entre el límite superior e inferior del intervalo y cualquier otro estado del valor intermedio en este intervalo. Los límites mayor e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir independientemente en los rangos más pequeños, y se engloban también dentro de la invención, sujeto de cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos, se incluyen también en la invención.

Determinados rangos se presentan en la presente memoria con valores numéricos que se preceden por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se emplea en la presente memoria para proporcionar el soporte literal para el número exacto que precede, así como un número que está cerca o aproximadamente cerca al número que el término precede. Para determinar si un número está cerca o se aproxima a un número específicamente mencionado, el número que se acerca o aproxima al número no mencionado puede ser un número que, en el contexto en el que se presente, proporciona el equivalente sustancial del número específicamente mencionado.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, se pueden proporcionar en combinación en una realización única. En cambio, varias características de la invención, que se describen en el contexto de una realización, para abreviar, se pueden proporcionar separadamente o en cualquier sub-combinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones pertenecientes a la invención se incorporan específicamente por la presente invención y se describen en la presente memoria de la misma manera como si todas y cada una de las combinaciones se describieran individual y explícitamente, hasta el punto de que tales combinaciones incorporan la materia objetivo que son, por ejemplo, compuestos que son compuestos estables (es decir, compuestos que se pueden producir, aislar, caracterizar, y ensayar en busca de actividad biológica). Además, todas las sub-combinaciones de las diferentes realizaciones y elementos de las mismas (por ejemplo, elementos de los grupos químicos enumerados en las realizaciones que describen tales variables) se incorporan también específicamente mediante la presente invención y se describen en la presente memoria como si todas y cada una de las sub-combinaciones se describieran individual y explícitamente en la presente memoria.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se emplean en la presente memoria tienen el mismo significado que el que comúnmente se entiende por cualquier experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Los materiales y métodos preferidos se describen a continuación.

Se debe indicar que, como se emplea en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes del plural a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Cabe señalar también que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta afirmación pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la enumeración de los elementos de las reivindicaciones, o el uso de una limitación "negativa".

Se aprecia que determinadas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, se pueden proporcionar en combinación en una realización única. En cambio, varias características de la invención, que se describen en el contexto de una única realización, para abreviar, se pueden proporcionar separadamente o en cualquier sub-combinación adecuada, sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método citado se puede llevar a cabo para los eventos mencionados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

### Descripción detallada

La presente divulgación proporciona tintes de cianina-azaindolina sustituidos con hidroxamato, conjugados de tintes, y métodos para preparar y emplear los mismos. En las secciones de a continuación se describen en más detalle realizaciones para cada uno.

En algunos casos, la incorporación de un hidroxamato y un sistema de anillo de azaindolina en un tinte de cianina da como resultado conjugados de tinte-sustrato (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos y otros conjugados biopolímeros) que son sustancialmente más fluorescentes, y que tienen alguna de las varias propiedades fluorescentes mejoradas, en comparación con los conjugados marcados con tintes convencionales. Los conjugados de tintes de la invención pueden proporcionar la reducción de efectos no deseados, tales como apagamiento, falta de fotoestabilidad, baja eficiencia cuántica, o cualquiera de los cambios no deseados en las propiedades fluorescentes de los tintes. La intensidad de fluorescencia mejorada de los conjugados tinte-biomolécula de la invención da como resultado un ensayo de mayor sensibilidad y un descenso de de la invención en sus espectros de

absorción en los aparatos en la conjugación de biopolímeros. Además, los tintes de la invención pueden tener también una fotoestabilidad significativamente mejorada. La adición del sustituyente hidroxamato aumenta la fotoestabilidad de los tintes de la invención. Estas mejoras dan como resultado una sensibilidad significativamente mayor en ensayos que emplean los tintes de la invención y los conjugados de los mismos, aunque se utilicen los filtros e instrumentación disponibles comercialmente en la actualidad para su empleo con tintes similares, tales como Cy5, Cy5,5, Alexa Fluor 700 y Cy7.

Además, en algunos casos, los tintes de la invención muestran una absorbancia máxima más larga que los tintes de carbocianina comunes, por lo que estos tintes se pueden seleccionar para combinar las principales líneas de emisión del láser HeNe (633 nm) o diodos de láser de longitudes de onda más largas. Resulta útil para las muestras que son transparentes a longitudes de onda infrarrojas. En algunos casos, los tintes de la invención tienen una absorbancia máxima dentro de los 30 nm (tal como dentro de 20 nm, dentro de 10 nm, o dentro de 5 nm) de la principal línea de emisión del láser HeNe.

En algunos casos, los tintes tienen una absorción máxima que es de 550 nm o mayor, tal como 580 nm o mayor, 590 nm o mayor, 600 nm o mayor, 610 nm o mayor, 620 nm o mayor, 630 nm o mayor, 640 nm o mayor, 650 nm o mayor, 660 nm o mayor, 680 nm o mayor, 690 nm o mayor, 700 nm o mayor, 710 nm o mayor, 720 nm o mayor, 730 nm o mayor, 740 nm o mayor, 750 nm o mayor, o incluso mayor.

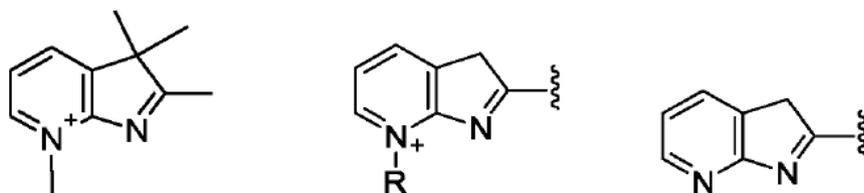
En algunos casos, los tintes tienen una emisión máxima que es de 600 nm o mayor, tal como 620 nm o mayor, 640 nm o mayor, 650 nm o mayor, 660 nm o mayor, 680 nm o mayor, 700 nm o mayor, 720 nm o mayor, 740 nm o mayor, 750 nm o mayor, 760 nm o mayor, 780 nm o mayor, 800 nm o mayor, o incluso mayor.

Los tintes de la invención y conjugados de los mismos, pueden tener una variedad de propiedades útiles para detecciones biológicas. En algunas realizaciones, los compuestos y/o conjugados de tinte, tienen mayor fotoestabilidad (por ejemplo, son fotoestables). En algunas realizaciones, los compuestos y/o conjugados de tinte tienen características de absorción y emisión deseables a mayores longitudes de onda, que reducen cualquier interferencia del autofluorescente o de la fluorescencia de fondo de muchos ligandos, receptores, y materiales en la muestra bajo ensayo, por ejemplo, sangre, orina, líquido cerebroespinal. En algunas realizaciones, los compuestos del tinte se conjugan fácilmente a una molécula biológica (por ejemplo, un anticuerpo) en un alto rendimiento con un pequeño o ningún cambio en las propiedades fluorescentes del tinte y en las propiedades de unión del ligando. En algunas realizaciones, los tintes tienen una alta eficiencia cuántica. En algunas realizaciones, los tintes tienen grandes coeficientes de extinción.

#### 30 Compuestos de Tinte de Cianina-Azaindolina Sustituídos con Hidroxamato

Los tintes de cianina-azaindolina sustituidos con hidroxamato son tintes basados en cianina que incluyen un primer sistema de anillo y un segundo sistema de anillo conectado a través de un grupo de unión de polimetino. El primer sistema de anillo puede ser un sistema de anillo de azaindolina que se sustituye con un grupo hidroxamato en cualquier posición adecuada. El segundo sistema de anillo puede ser cualquier sistema de anillo adecuado. En algunas realizaciones, el segundo sistema de anillo incluye un anillo heterocíclico de 5 miembros. El tinte puede incluir además uno o más restos de grupos reactivos para la conjugación del tinte a un sustrato. El tinte puede incluir uno o más grupos de agua soluble en cualquier posición adecuada.

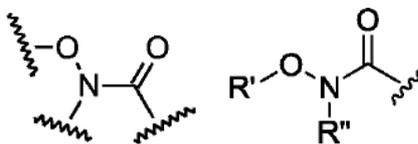
El sistema de anillo de azindolina se puede conectar al grupo de unión de polimetino en cualquier posición adecuada. En algunos casos, el sistema de anillo de azaindolina se conecta al grupo de unión de polimetino en la posición 2. En algunos casos, el sistema del anillo de azaindolina incluye un resto de piridio incorporado en una estructura de anillo de indolina para formar el anillo de azaindolina. Como se emplea en la presente memoria, los términos "sistema de anillo de azaindolina", "azaindolina", y "derivado de azaindolina", se emplean de forma intercambiable y, por sí mismo o como parte de otro grupo, significa cualquier resto que contiene una de las siguientes estructuras de anillo fusionado o derivado del mismo:



45 Estructura de Azaindolina (R es un sustituyente N)

Se entenderá que los restos de azaindolina de la invención se han dibujado en una u otra de las estructuras de resonancia electrónicas particulares. Cada aspecto de la inmediata invención se aplica tanto a los tintes que se dibujan formalmente con otras estructuras de resonancia permitidas, así como la carga electrónica en los tintes de la invención que se deslocalizan a través del propio tinte.

En algunas realizaciones, el sistema del anillo de azaindolina se sustituye con un grupo hidroxamato en la posición 4. En algunas realizaciones, el sistema del anillo de azaindolina se sustituye con un grupo hidroxamato en la posición 5. En algunas realizaciones, el sistema del anillo de azaindolina se sustituye con un grupo hidroxamato en la posición 6. Como se emplea en la presente memoria, los términos "hidroxamato", "ácido hidroxámico", "éster hidroxámico", "hidroxámico", "derivado hidroxámico" se emplean de forma intercambiable y, por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un resto que contiene la siguiente estructura o derivado de la misma:



Estructuras de Hidroxamato

donde R y R'' son independientemente hidrógeno o un sustituyente. Como tal, como se emplea en la presente memoria, el término hidroxamato abarca tanto los grupos del ácido hidroxámico como los ésteres hidroxámicos. El grupo hidroxamato se puede unir al sistema del anillo del tinte a través de cualquier átomo adecuado, el O, el N o el carbonilo del hidroxamato. En algunos casos, el grupo hidroxamato se une a través del carbonilo al sistema del anillo de azaindolina. En algunos casos, el tinte es un compuesto de tinte de cianina-azaindolina sustituido con un 5-hidroxamato, por ejemplo, donde un primer sistema del anillo de azaindolina se sustituye en posición 5 con un grupo hidroxamato.

En algunas realizaciones, el segundo sistema del anillo incluye un anillo heterocíclico de 5 miembros que se conecta al grupo de unión de polimetino del tinte a través de cualquier posición adecuada del anillo. En determinadas realizaciones, el anillo heterocíclico de 5 miembros incluye un átomo de carbono en el anillo que forma un enlace doble hasta el grupo de unión divalente de polimetino. En algunos casos, el anillo heterocíclico de 5 miembros incluye uno o más átomos de nitrógeno en el anillo. En algunos casos, cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo), N(acilo) y N(alquilo). En determinados casos, el anillo heterocíclico de cinco miembros contiene un átomo de nitrógeno. En algunas realizaciones, el anillo heterocíclico de cinco miembros es un anillo heterociclo saturado de cinco miembros fusionado a un anillo aromático insaturado o sistema de anillo. En algunos casos, el anillo heterocíclico de cinco miembros es un anillo de pirrolidina. En algunos casos, el anillo de pirrolidina se fusiona opcionalmente en las posiciones 4/5 a un sistema de anillo o anillo de arilo o heteroarilo. En algunos casos, el anillo de pirrolidina se sustituye en la posición 2 con un grupo de unión de polimetino del tinte.

El anillo heterocíclico de 5 miembros se puede fusionar opcionalmente a cualquier posición adecuada de uno o más anillos aromáticos, por ejemplo, uno o más anillos de heteroarilo como se describe anteriormente para proporcionar el segundo sistema de anillo de los compuestos de tinte. Se puede seleccionar cualquier anillo adecuado de arilo y heteroarilo para la inclusión en el segundo sistema de anillo. En algunos casos, uno o más anillos de arilo o heteroarilo fusionado al anillo heterocíclico de 5 miembros, incluye sólo anillos de seis miembros. Anillos de arilo y heteroarilo y sistemas de anillo de interés para incluir en el segundo sistema de anillo de los compuestos de tinte incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirrolilo, indolilo. En determinados casos, en la Fórmula I, B se fusiona opcionalmente a un anillo arilo o heteroarilo. En algunos casos, el anillo heterocíclico de 5 miembros se fusiona opcionalmente a dos anillos arilo y/o heteroarilo. En determinados casos, el anillo heterocíclico de 5 miembros se fusiona opcionalmente a tres anillos arilo y/o heteroarilo. En algunas realizaciones, el anillo heterocíclico de 5 miembros se fusiona a un anillo benzo. En algunos casos, el anillo heterocíclico de 5 miembros se fusiona a un anillo piridilo. En algunas realizaciones, el segundo sistema de anillo es un sistema de anillo de indolina o azaindolina. En determinadas realizaciones, el anillo heterocíclico de 5 miembros se fusiona a un arilo policíclico. En determinadas realizaciones, el anillo heterocíclico de 5 miembros se fusiona a un naftaleno. En determinadas realizaciones, el anillo heterocíclico de 5 miembros se fusiona a un antraceno. El anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos se sustituyen cada uno opcionalmente con uno o más sustituyentes.

En algunos casos, el grupo de unión polimetino se selecciona para formar un sistema conjugado de enlaces insaturados entre un primer sistema de anillo de azaindolina y un segundo sistema de anillo que incluye un anillo heterocíclico de 5 miembros. El grupo de unión de polimetino divalente puede incluir un eje central de 1 a 15 átomos de carbono (por ejemplo, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, ó 15 átomos), donde cada átomo de carbono del eje central se puede sustituir opcional e independientemente. Como se emplea en la presente memoria, el grupo de unión de polimetino divalente abarca un grupo de unión que incluye un grupo metino, por ejemplo, 1 átomo de carbono. En algunas realizaciones, el grupo de unión de polimetino incluye un eje central de 3 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, el grupo de unión de polimetino incluye un eje central de 5 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, el grupo de unión de polimetino incluye un eje central de 7 átomos de carbono. En algunos casos, el grupo de unión de polimetino se sustituye con un RGM. En determinados casos, el grupo RGM se conecta a través de un átomo de carbono terminal del eje central.

El tinte de cinina-azaindolina sustituido con hidroxamato se puede sustituir además con uno o más sustituyentes en

cualquier posición adecuada. Se puede incluir cualquier sustituyente adecuado. En algunos casos, el compuesto incluye uno o más sustituyentes que incluyen un resto del grupo reactivo (RGM). En algunos casos, el compuesto incluye uno o más sustituyentes que incluyen un sustrato. En determinados casos, el compuesto incluye uno o más sustituyentes (por ejemplo, 1, 2, 3, o más sustituyentes) que incluyen un grupo soluble en agua (por ejemplo, un grupo polar o un grupo cargado, tal como un sulfonato, un carboxilo, un amonio o un grupo fosfato).

Uno o más grupos RGM se pueden incluir directamente o indirectamente en cualquier posición adecuada de la estructura del tinte. En algunos casos, el anillo heterocíclico de 5 miembros incluye un átomo N, y el átomo N se sustituye con un enlazador-RGM. En determinados casos, el sustituyente 5-hidroxamato del grupo de azaindolina se sustituye además con un enlazador-RGM. En algunos casos, el grupo de unión de polimetino se sustituye para incluir un enlazador-RGM.

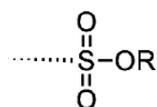
Como se emplea en la presente memoria, un "resto de grupo reactivo", indicado como "RGM", se refiere a un resto en un compuesto que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional en un compuesto diferente para formar un enlace covalente (por ejemplo, conjugación). Se pueden utilizar una gran variedad de restos de grupos reactivos (RGM) y químicas de conjugación en los compuestos de los tintes de la invención y en los conjugados de los mismos, como se describe con mayor detalle abajo. RGMs de interés incluyen, pero no se limitan a, una acrilamida, una amina, un ácido carboxílico, un éster de un ácido carboxílico activado, una acilazida, un acilnitrilo, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, un haluro de arilo, una azida, una aziridina, un boronato, un diazoalcano, una halogenoacetamida, una halotriazina, una hidrazina, una hidroxilamina, un éster imido, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un complejo de platino reactivo, un haluro sulfonilo o un derivado de psoraleno. En determinados casos, RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida. En algunos casos, el resto del grupo reactivo es un electrófilo o un nucleófilo que puede formar un enlace covalente a través de la exposición a un grupo de un sustrato correspondiente que es nucleófilo o el electrófilo compatible, respectivamente. En otros casos, el resto del grupo reactivo puede ser un grupo fotoactivable, que se vuelve reactivo químicamente sólo después de iluminarlo con una luz de una longitud de onda apropiada. En algunos casos, la reacción de conjugación entre el tinte reactivo y la sustancia a conjugar, da como resultado uno o más átomos del grupo reactivo RGM que se incorpora dentro del nuevo enlace L que une el tinte al sustrato conjugado. Algunos ejemplos de grupos reactivos y enlaces se muestran en la Tabla 3, donde la reacción de un grupo electrofílico y un grupo nucleofílico produce un enlace covalente.

L es un enlazador que puede conectar el resto de tinte de cianina y un RGM. En algunos casos, los compuestos de tinte de cianina se pueden conjugar bien directamente a un RGM o a un sustrato, o alternativamente, indirectamente a un RGM o a un sustrato a través de un enlazador, L. Para ahorrar en apuntes, ambas alternativas se describen en la presente memoria mediante una única estructura que tiene un enlazador opcional. Una realización de una estructura que tiene un enlazador opcional, L, en la cual no está presente el enlazador, se puede describir como la estructura en la que L es "nulo" o "está ausente". Como se emplea en la presente memoria, un "enlazador", que se denomina "L", entre dos restos, se refiere como "opcional" si los dos restos se pueden unir bien directamente a cada una de ellas o través del enlazador como un intermediario. Este lenguaje se emplea para simplificar la descripción de estructuras alternativas que difieren sólo por la presencia o ausencia del enlazador. En la presente invención, por ejemplo, las moléculas de tinte de cianina se pueden conjugar bien directamente al biopolímero o, alternativamente, indirectamente al biopolímero a través de un enlazador, L. Para ahorrar en apuntes, ambas alternativas se describen en la presente memoria mediante una única estructura que tiene un enlazador opcional. Una realización de una estructura que tiene un enlazador opcional, L, en la cual no está presente el enlazador, se puede describir como la estructura en la que L es "nulo". En los tintes de la invención se pueden utilizar cualquier grupo de unión adecuado. Por ejemplo, el resto de enlazador puede incluir una o más unidades de monómero, tal como óxido de etileno de fórmula  $-(CH_2-CH_2-O)-$  o  $-(O-CH_2-CH_2)-$ . El número de tales unidades puede variar, siendo la cantidad de tales unidades de 2 a 10, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4, por ejemplo algunas realizaciones incluyen 2 unidades. Además, la última unidad de monómero (por ejemplo, un grupo de óxido de etileno) en el grupo enlazador se puede sustituir además por uno o más grupos funcionales como se definen en la presente memoria, tal como, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, alquino, alquino sustituido, hidroxilo, alcoxilo, alcoxilo sustituido, amino, amino sustituido, acilo, carboxilo, éster carboxilo, acilamino, aminoacilo, alquilamida, alquilamida sustituida, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclilo, o heterociclilo sustituido. En algunos casos, la última unidad de monómero (por ejemplo, un grupo de óxido de etileno final) en el grupo enlazador se puede sustituir además por un carboxilo, o un grupo carboxilo protegido, tal como un grupo carboxilo protegido con perfluorofenilo. En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, ácido sulfoamido, poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo. En determinadas realizaciones, el grupo de unión comprende de 10-15 átomos de carbono y/o 0-6 heteroátomos. Adicionalmente, los enlazadores pueden comprender nucleótidos modificados o no modificados, nucleósidos, polímeros, azúcares y otros carbohidratos, poliéteres, tal como por ejemplo, polietilenglicoles, polialcoholes, polipropileno, propilenglicoles, mezclas de etileno y propilenglicoles, polialquilaminas, poliaminas, tal como espermidina, poliésteres, tal como poli(acrilato de etilo), polifosfodiésteres, y alquilenos. En determinadas realizaciones, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. Un enlazador se puede separar o no.

En algunas realizaciones, el compuesto de tinte contiene uno o más sustituyentes L-RGM, donde RGM es un resto del grupo reactivo que se une al tinte a través de un enlace covalente L. En determinadas realizaciones, el compuesto del tinte se sustituye sólo con un RGM o un sustrato conjugado. En algunas realizaciones, el compuesto

de tinte contiene dos o más grupos L-RGM, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50 o incluso más grupos L-RGM, donde el RGM es un grupo reactivo que se une al tinte a través de un enlace covalente L. En determinadas realizaciones, L es un enlace covalente que un el tinte al RGM que contiene múltiples átomos intermedios que sirven como un separador.

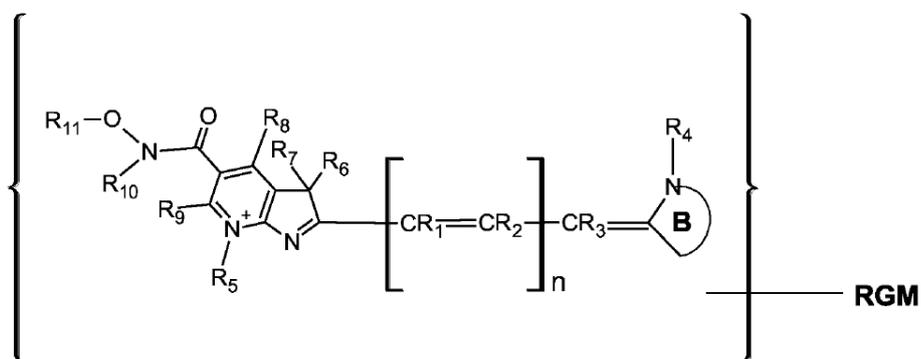
- 5 Los compuestos de tinte pueden incluir uno o más sustituyentes solubles en agua en cualquier posición adecuada (por ejemplo, un sustituyente polar o cargado) que se puede incluir para impartir un descenso en la solubilidad del tinte en agua. En algunos casos, los compuestos incorporan al menos un grupo cargado para incrementar la solubilidad en agua. Se puede incorporar cualquier grupo cargado adecuado. Grupos cargados de interés, incluyen pero no se limitan a, un sulfonato, un amonio, un carboxilo, un fosfato, un amino, un amino sustituido y similares. El término "sulfonato", por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a cualquier compuesto o sustituyente que  
10 contiene ácido sulfónico, una sal del mismo, por ejemplo, uno o más restos que tienen la siguiente estructura,



- 15 , donde R es hidrógeno o un contraión, tal como un ión metálico o un ión de amonio. De manera similar, "carboxilo" significa ácido carboxílico o sal del ácido carboxílico. "Fosfato", como se emplea en la presente memoria, es un éster de ácido fosfórico, e incluye sales de fosfato. "Fosfonato", como se emplea en la presente memoria, significa ácido fosfónico e incluye sales de fosfonato. Como se emplea en la presente memoria, a menos que se especifique de otra manera, las porciones de alquilo de sustituyentes tales como alquilo, alcoxilo, arilquilo, arilamino, dialquilamino, trialquilamónio, o perfluoroalquilo son opcionalmente saturados, insaturados, lineales o ramificados, y todos los sustituyentes alquilo, alcoxilo, alquilamino y dialquilamino, se sustituyen además  
20 opcionalmente ellos mismos por carboxilo, sulfonato, amino o hidroxilo. Se puede incorporar cualquier sustituyente polar adecuado. Sustituyentes polares de interés incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo que contiene sustituyentes, carbohidratos, y grupos polietilenglicol o enlazadores.

- En algunas realizaciones, el tinte de cianina azaindolina sustituido con hidroxamato, que incluye un grupo 5-  
25 hidroxamato-azaindolina unido a un anillo heterocíclico de 5 miembros a través de un grupo de unión de polimetino divalente, donde uno o más grupos de 5-hidroxamato-azaindolina, el grupo de unión divalente de polimetino y el anillo heterocíclico de 5 miembros se sustituyen con un resto del grupo reactivo (RGM).

En algunos casos, el tinte se describe mediante la Fórmula I:



Fórmula I

- 30 donde el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno y, comprende además de cero a tres anillos aromáticos fusionados; en donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo), N(ácido) y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos se sustituyen opcionalmente con uno o  
35 más sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tior, un sulfonato, un fosfonilo, y un L-RGM; n es de 0 a 3; R1-R3 son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tior, un alquiltior, un ariltior, un heteroariltior, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonialquilo, un sulfonialquilo, o un L-RGM; R4 y R5 son cada uno  
40 independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos; un arilalquilo, un heteroalquilo, un carboxialquilo, un fosfonialquilo, o un L-RGM; R6 y R7 son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un fosfonialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R8 y R9 son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20

carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, y un L-RGM;  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; RGM es un grupo reactivo químicamente; y L es un enlazador.

- 5 En algunos casos, en la Fórmula I, el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno y además incluye de cero a tres anillos aromáticos fusionados; donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo), N(acilo) y N(alquilo). En determinados casos, B es un anillo heterocíclico de cinco miembros que contienen un átomo de nitrógeno. En algunas realizaciones, B es un anillo heterociclo de cinco miembros saturado fusionado a un anillo aromático insaturado. En determinados casos, cada átomo del anillo B se selecciona independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), N, N(arilo), N(acilo) y N(alquilo). En algunos casos, B es un anillo de pirrolidina. En algunos casos, B es un anillo de pirrolidina fusionado opcionalmente en las posiciones 4/5 a un anillo o sistema de anillo arilo o heteroarilo. En algunos casos, el anillo B es un anillo de pirrolidina sustituido en la posición 2 con un grupo polimetino.

El anillo B se puede fusionar opcionalmente a uno o más anillos aromáticos, por ejemplo, uno o más anillos de arilo o heteroarilo como se describe anteriormente para proporcionar el segundo sistema de anillo de los compuestos de tinte. Se puede seleccionar cualquier anillo de arilo y heteroarilo adecuado para la inclusión en el segundo sistema de anillo. En algunos casos, uno a más anillos arilo o heteroarilo fusionados a B incluyen sólo anillos de seis miembros. Anillos y sistemas de anillo de arilo y heteroarilo de interés para incluir en el segundo sistema de anillo de los compuestos de tinte incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirroloilo, indolilo. En determinados casos, en la Fórmula I, B se fusiona opcionalmente a un anillo arilo o heteroarilo. En algunos casos, en la Fórmula I, B se fusiona opcionalmente a tres anillos arilo y/o heteroarilo. En algunas realizaciones, el anillo B se fusiona a un anillo benzo. En algunos casos, B se fusiona a un anillo de piridilo. En algunas realizaciones, el segundo sistema de anillo es un sistema de anillo de indolina o azaindolina. En determinadas realizaciones, el anillo B se fusiona a un arilo policíclico. En determinadas realizaciones, el anillo B se fusiona a un naftaleno. En determinadas realizaciones, el anillo B se fusiona a un antraceno.

El anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos se sustituyen opcionalmente con uno o más sustituyentes que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, y un L-RGM.

En algunas realizaciones, en la Fórmula I, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula I, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula I, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula I, n es 3.

En algunos casos, en la Fórmula I,  $R_1$ - $R_3$  son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM. En determinados casos,  $R_1$ - $R_3$  son cada uno un hidrógeno. En determinados casos, en la Fórmula I, dos de los  $R_1$ - $R_3$  se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula I, uno de los  $R_1$ - $R_3$ , es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-RGM.

En algunos casos, en la Fórmula I,  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM.

En algunos casos, en la Fórmula I,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un RGM, un sulfonato, un fosfato, amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de  $-(CH_2)_m-Z$ , donde m es 1-12 y Z se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM.

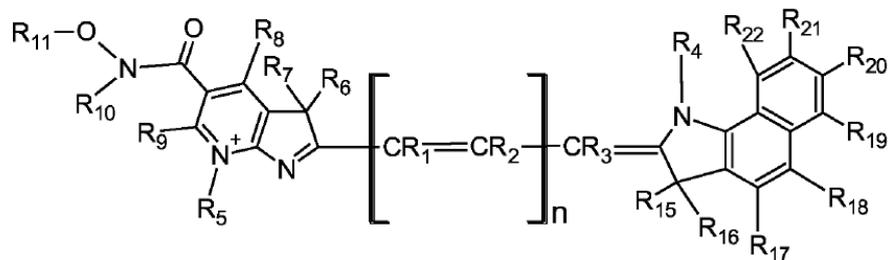
En determinados casos, en la Fórmula I,  $R_6$  y  $R_7$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un arilalquilo, un heteroalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula I,  $R_6$  y  $R_7$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula I,  $R_6$  y  $R_7$  son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula I,  $R_6$  y  $R_7$  son un metilo cada uno. En algunas realizaciones,  $R_6$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_7$  es L-RGM. En algunas realizaciones,  $R_7$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde m es 1-12 y Z se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM).

En algunas realizaciones, en la Fórmula I,  $R_8$  y  $R_9$  son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un fosfonilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula I,  $R_8$  y  $R_9$



- 5 En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno un hidrógeno; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> y R<sub>20</sub> son un hidrógeno cada uno; R<sub>18</sub> es sulfonato; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-RGM.
- 10 En determinados casos, en la Fórmula II, L es nulo, es un alquilo, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfaminoácido, poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo. En algunas realizaciones, en la Fórmula II, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. En algunas realizaciones, en la Fórmula II, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula II, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula II, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula II, n es 3.
- 15 En determinados casos, en la Fórmula II, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM. En determinados casos, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula II, dos de R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> se unen cíclicamente para formar un anillo de seis miembros carbociclo o heterociclo. En determinadas realizaciones, en la Fórmula II, uno de R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-RGM.
- 20 En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un RGM, un sulfonato, un fosfonato, amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM.
- 25 En algunas realizaciones, en la Fórmula II, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula II, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula II, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula II, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula II, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son metilo cada uno. En algunas realizaciones, R<sub>6</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>7</sub> es L-RGM. En algunas realizaciones, R<sub>7</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM). En algunas realizaciones, R<sub>15</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>16</sub> es L-RGM. En algunas realizaciones, R<sub>16</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM).
- 30 En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son independientemente un hidrógeno o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno un hidrógeno. En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones, R<sub>9</sub> se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina, por ejemplo, para formar un anillo de 6 miembros.
- 35 En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula II, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula II, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula II, R<sub>10</sub> es L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula II, R<sub>11</sub> es L-RGM.
- 40 Uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>20</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se pueden tomar en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como un anillo de 5, 6, 7 ó 8 miembros).
- 45 En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.
- En determinadas realizaciones, RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.
- 55 En determinadas realizaciones, en la Fórmula II, al menos uno de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>20</sub> incluye un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula II, dos de los R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>20</sub> incluyen un L-RGM. En otros casos, en la Fórmula II, -RGM es opcional.

En algunas realizaciones, el compuesto de tinte se describe mediante la Fórmula III:



Fórmula III

5 donde, n es de 0 a 3; R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonalquilo, o un L-RGM; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonalquilo, o un L-RGM; R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que  
10 tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un fosfonilalquilo, un sulfonalquilo, o un L-RGM; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; RGM es un grupo reactivo químicamente; L es un enlazador; y opcionalmente, uno más R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

En algunas realizaciones, en la Fórmula III, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula III, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula III, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula III, n es 3.

20 En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula III, dos de los R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis  
25 miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula III, uno de R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> es un alcoxilo, un ariloxilo, o L-RGM.

En algunas realizaciones, en la Fórmula III, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula III, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que  
30 tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula III, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con un o más sustituyentes que se seleccionan de un RGM, un sulfonato, un fosfato, amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM.

En algunas realizaciones, en la Fórmula III, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> son un metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son un metilo cada uno. En algunas  
40 realizaciones, R<sub>6</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>7</sub> es L-RGM. En algunas realizaciones, R<sub>7</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM). En algunas realizaciones, R<sub>15</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>16</sub> es L-RGM. En algunas realizaciones, R<sub>16</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM).

En algunas realizaciones, en la Fórmula III, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno, un alquilo que  
45 tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula III, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula III, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula III, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son un hidrógeno cada uno. En algunos casos, en la Fórmula III, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son un hidrógeno cada uno. En  
50

determinadas realizaciones, R<sub>9</sub> se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina, por ejemplo, para formar un anillo de 6 miembros.

En algunas realizaciones, en la Fórmula III, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula III, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula III, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>10</sub> es L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula III, R<sub>11</sub> es L-RGM.

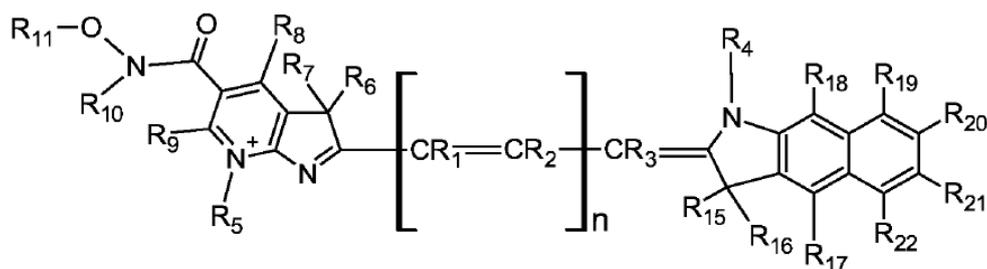
En algunas realizaciones, en la Fórmula III, uno o más de R<sub>4</sub>, y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como un anillo de 5, 6, 7 ó 8 miembros).

En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

En determinadas realizaciones, RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.

En algunos casos, en la Fórmula III, al menos un R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub> incluye un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula III, dos de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub> incluye un L-RGM. En otros casos, en la Fórmula III, -RGM es opcional.

En algunos casos, el compuesto de tinte se describe mediante la Fórmula IV:



Fórmula IV

donde R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un eteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; uno o más de los R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

En algunas realizaciones, en la Fórmula IV, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula IV, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula IV, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula IV, n es 3.

En determinados casos, en la Fórmula IV, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula IV, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula IV, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IV, uno de R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-RGM.

En algunas realizaciones. En la Fórmula IV, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IV, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula IV, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir

con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un RGM, un sulfonato, un fosfato, amino, amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM.

- 5 En algunas realizaciones, en la Fórmula IV,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula IV,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula IV,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula IV,  $R_6$  y  $R_7$  son un metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula IV,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son un metilo cada uno. En algunas realizaciones,  $R_6$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_7$  es L-RGM. En algunas realizaciones,  $R_7$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM). En algunas realizaciones,  $R_{15}$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_{16}$  es L-RGM. En algunas realizaciones,  $R_{16}$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM).
- 15 En algunas realizaciones, en la Fórmula IV,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula IV,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula IV,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son independientemente un hidrógeno o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula IV,  $R_8$ ,  $R_9$  y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son un hidrógeno cada uno. En algunos casos, en la Fórmula IV,  $R_{17}$ - $R_{22}$  son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones,  $R_9$  se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina, por ejemplo, para formar un anillo de 6 miembros.

25 En algunas realizaciones, en la Fórmula IV,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IV,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula IV,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo metilo, etilo, propilo, ispropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula IV,  $R_{10}$  es L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula IV,  $R_{11}$  es L-RGM.

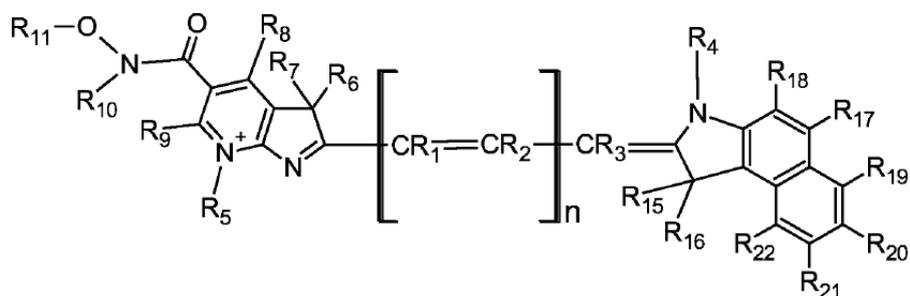
30 En algunas realizaciones, en la Fórmula IV, uno o más de  $R_4$  y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_8$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{22}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como un anillo de 5, 6, 7 ó 8 miembros).

En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

En determinadas realizaciones, RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.

35 En algunos casos, en la Fórmula V, al menos uno de los  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{22}$  incluye un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IV, dos de los  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{22}$  incluye un L-RGM. En otros casos, en la Fórmula IV, -RGM es opcional.

En algunas realizaciones, el compuesto de tinte se describe mediante la Fórmula V:



Fórmula V

- 40 donde,  $n$  es de 0 a 3;  $R_1$ - $R_3$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, o un sulfonilalquilo o un L-RGM;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, un fosfonilalquilo, o un L-RGM;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, carboxiarilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno

independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; RGM es un grupo reactivo químicamente; L es un enlazador; y opcionalmente, uno o más de  $R_4$  y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_8$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{18}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_1$ ,  $R_3$  son cada uno independientemente un hidrógeno, o un L-RGM;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un sulfonato, o un L-RGM; y  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, un carboxialquilo, o un L-RGM.

En algunas realizaciones, en la Fórmula V,  $R_1$ - $R_3$  son un hidrógeno cada uno;  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un sulfonato; y  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, o un L-RGM.

En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

En determinadas realizaciones, RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.

En algunas realizaciones, en la Fórmula V, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula V, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula V, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula V, n es 3.

En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_1$ - $R_3$  son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_1$ ,  $R_3$  son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula V, dos de los  $R_1$ - $R_3$  se unen cíclicamente para formar un anillo heterociclo o carbociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula V, uno de los  $R_1$ - $R_3$  es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-RGM.

En algunas realizaciones, en la Fórmula V,  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula V,  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula V,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un RGM, un sulfonato, un fosfonato, un amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de  $-(CH_2)_m-Z$ , donde m es 1-12 y Z se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM.

En algunas realizaciones, en la Fórmula V,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_6$  y  $R_7$  son un metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son un metilo cada uno. En algunas realizaciones,  $R_6$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_7$  es L-RGM. En algunas realizaciones,  $R_7$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde m es 1-12 y Z se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM). En algunas realizaciones,  $R_{15}$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_{16}$  es L-RGM. En algunas realizaciones,  $R_{16}$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde m es 1-12 y Z se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM).

En algunas realizaciones, en la Fórmula V,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula V,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula V,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula V,  $R_8$ , y  $R_9$  son un hidrógeno cada uno. En algunos casos, en la Fórmula V,  $R_{17}$ - $R_{22}$  son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones,  $R_9$  se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.

En algunas realizaciones, en la Fórmula V,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En

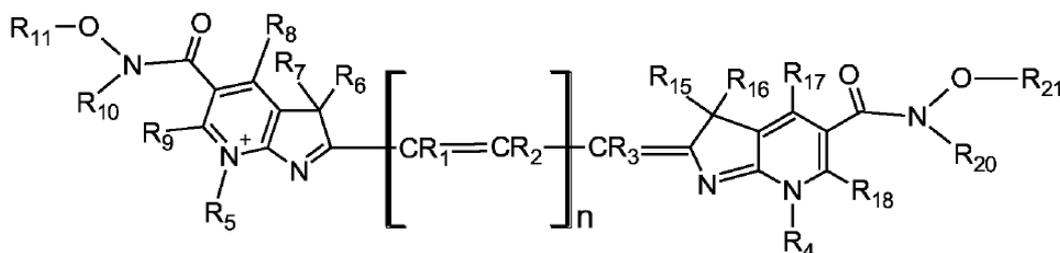
determinadas realizaciones, en la Fórmula V,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula V,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula V,  $R_{10}$  es L-RGM. En determinados casos en la Fórmula V,  $R_{11}$  es L-RGM.

- 5 En algunas realizaciones, en la Fórmula V, uno o más de  $R_4$ , y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_5$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{22}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como un anillo de 5, 6, 7 ó 8 miembros).

En algunos casos, en la Fórmula V, al menos uno de los  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{22}$  incluye un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula V, dos de los  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{22}$  incluye un L-RGM. En otros casos, en la Fórmula V, -RGM es opcional.

10 En determinados casos el compuesto de tinte se describe mediante la Fórmula VI:

En determinados casos el compuesto de tinte se describe mediante la Fórmula VI:



Fórmula VI

15 donde: n es 0, 1, 2 ó 3;  $R_1$ - $R_3$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, y un L-RGM;  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{20}$  y  $R_{21}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un sulfoalquilo, o un L-RGM; RGM es un grupo reactivo químicamente; L es un enlazador; y opcionalmente, uno o más de  $R_4$  y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_5$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{18}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

En determinados casos,  $R_1$ - $R_3$  son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula VI, dos de los  $R_1$ - $R_3$  se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula VI, uno de los  $R_1$ - $R_3$  es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-RGM.

30 En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno más sustituyentes que se seleccionan de un RGM, un sulfonato, un fosfato, amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de  $-(CH_2)_m-Z$ , donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM.

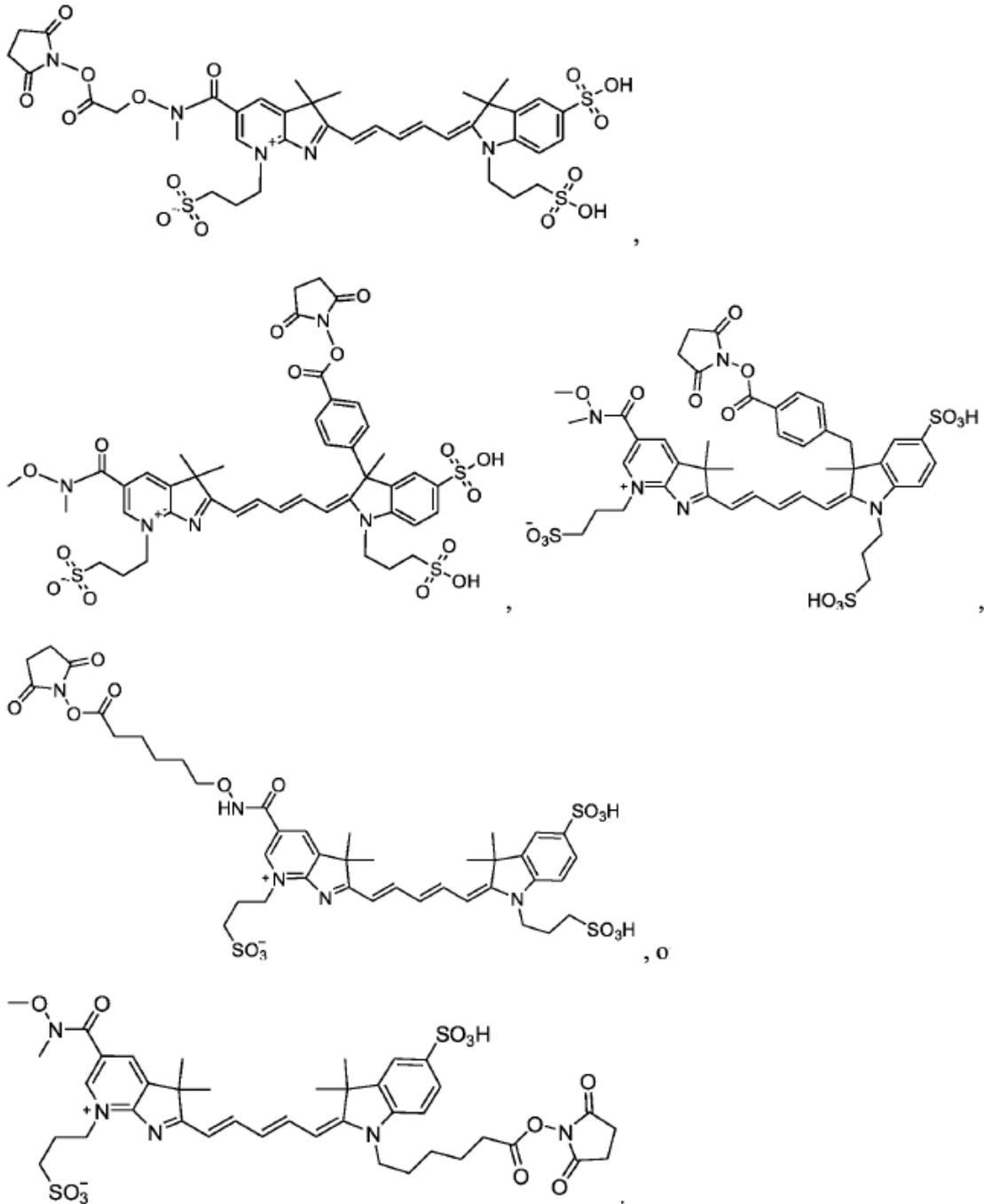
35 En determinados casos, en la Fórmula VI,  $R_6$  y  $R_7$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula VI,  $R_6$  y  $R_7$  son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula VI,  $R_6$  y  $R_7$  son un metilo cada uno. En algunas realizaciones,  $R_6$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_7$  es L-RGM. En algunas realizaciones,  $R_7$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y RGM).

40 En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_8$  y  $R_9$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_8$  y  $R_9$  son cada uno independientemente un hidrógeno o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_8$  y  $R_9$  son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones,  $R_9$  se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina, por ejemplo, para formar un anillo de 6 miembros.

45 En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones,  $R_{18}$  se une cíclicamente al N-R4 adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.

En algunos casos, en la Fórmula VI,  $R_1$ - $R_3$  son cada uno independientemente un hidrógeno, o un L-RGM;  $R_4$  y  $R_5$

- son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un sulfonato, un fosfonilo o un L-RGM; y R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM.
- 5
- En determinados casos, en la Fórmula VI, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, o un sulfonato; y R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-RGM.
- 10
- En determinados casos, en la Fórmula VI, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.
- En determinadas realizaciones, en la Fórmula VI, RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.
- En algunos casos, en la Fórmula VI, n es 0. En algunos casos, en la Fórmula VI, n es 1. En algunos casos, en la Fórmula VI, n es 2. En algunos casos, en la Fórmula VI, n es 3.
- 15
- En determinadas realizaciones, en la Fórmula VI, al menos uno de los de los R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub>, R<sub>15</sub>-R<sub>18</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>21</sub> incluye un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IV, dos de los R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub>, R<sub>15</sub>-R<sub>18</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>21</sub> incluyen un L-RGM.
- En determinadas realizaciones, en las Fórmulas I-VI, R<sub>11</sub> incluye un L-RGM. En determinadas realizaciones, en las Fórmulas I-VI, R<sub>4</sub> incluye un L-RGM. En determinados casos, en las Fórmulas I-VI, al menos uno de los R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> incluye un L-RGM.
- 20
- En determinados casos, en las Fórmulas I-VI, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son metilo. En determinados casos, en las Fórmulas I-VI, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son metilo.
- En algunas realizaciones, en las Fórmulas I-VI, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente  $-(CH_2)_q-Z$ , en donde Z es un grupo soluble en agua y q es un número entero de 1 a 12. En determinadas realizaciones, Z es SO<sub>3</sub>H y n es 3.
- 25
- En algunas realizaciones, en las Fórmulas II-VI, R<sub>15</sub> es un alquilo bajo y R<sub>16</sub> es  $-(CH_2)_mY-RGM$ , donde Y es un cicloalquilo, un heterocicloalquilo, un heterociclo, o un arilo y m es 0 o un número entero de 1 a 6. En algunos casos, Y es un fenilo, un piridilo, un ciclohexilo, o un piperidinilo. En determinadas realizaciones, R<sub>15</sub> es metilo. En determinados casos, RGM es un éster activo. En algunos casos, Y es fenilo. En determinadas realizaciones, R<sub>16</sub> es  $-(CH_2)_m-Ph-C(O)-NHS$ , donde m es 0 ó 1 y NHS es N-hidroxilo succinimidilo.
- 30
- En determinados casos, en las Fórmulas I-IV, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son un metilo cada uno.
- En determinadas realizaciones, el compuesto de tinte no incluye un sustituyente que contiene PEG. En determinadas realizaciones el compuesto de tinte no incluye un polímero óxido polialquileno soluble en agua de PM 300 a 5.000.
- 35
- En determinadas realizaciones, el compuesto de tinte no incluye un enlazador separador. En determinadas realizaciones, el compuesto de tinte no incluye un enlazador que incluya un grupo  $-C=N$  lábil. En algunos casos, el compuesto de tinte se describe mediante una de las siguientes estructuras:



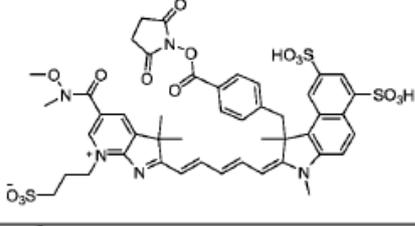
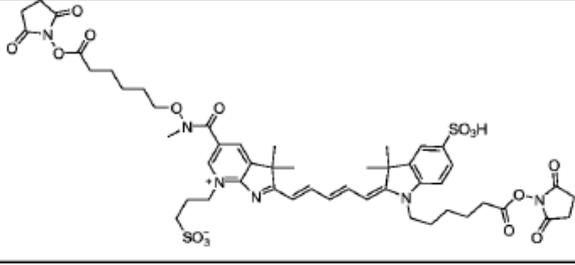
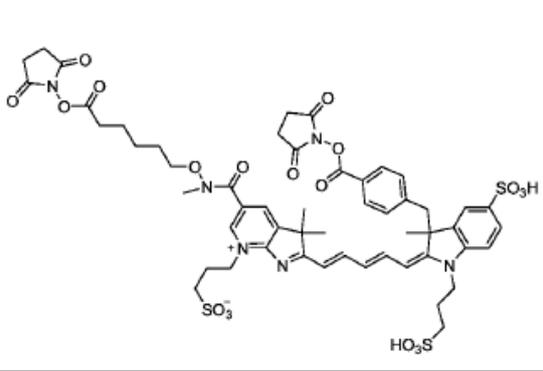
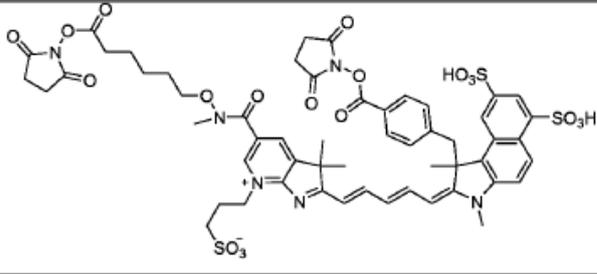
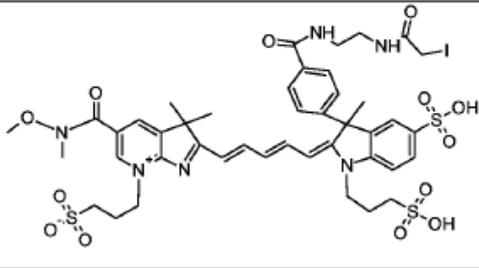
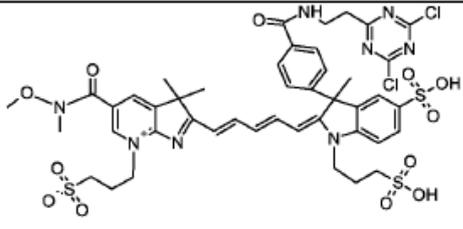
5 Los tintes con un L-RGM marcan una amplia variedad de sustancias orgánicas o inorgánicas que contienen o se modifican para contener grupos funcionales con reactividad adecuada, dando como resultado una unión química de la sustancia conjugada. Algunas realizaciones de los tintes reactivos de la presente divulgación se proporcionan en la Tabla 1, de abajo. El número de tintes reactivos en la Tabla 1 corresponde a la numeración de los compuestos descrita en los ejemplos.

Tabla 1: Ejemplos de Tintes de Cianina Reactivos

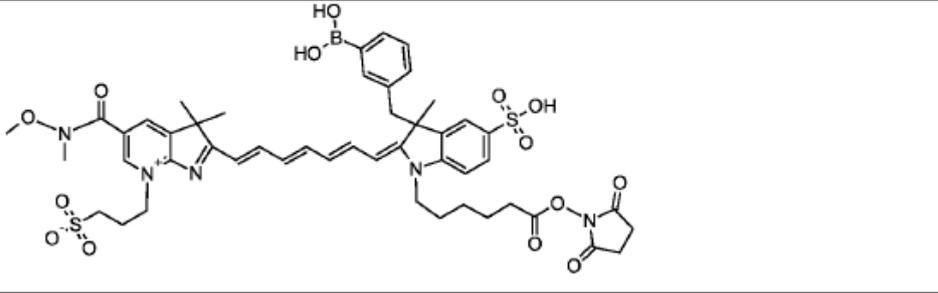
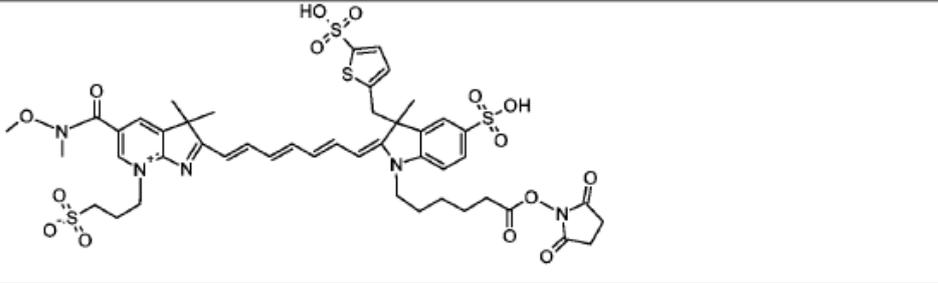
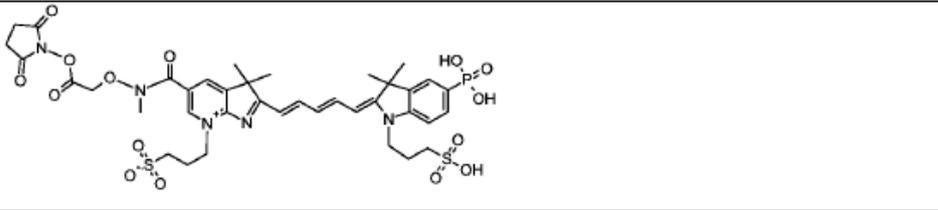
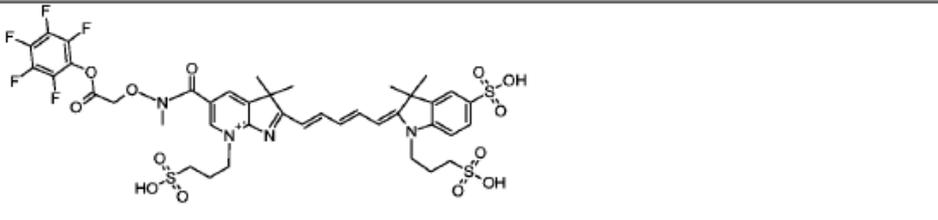
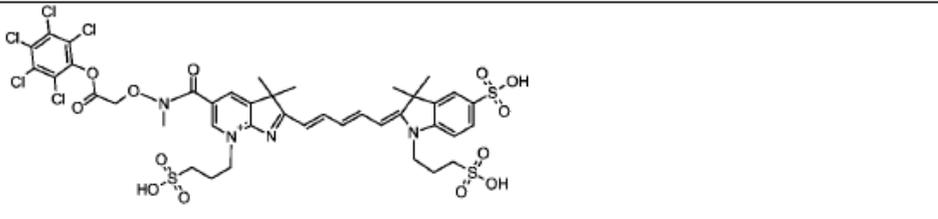
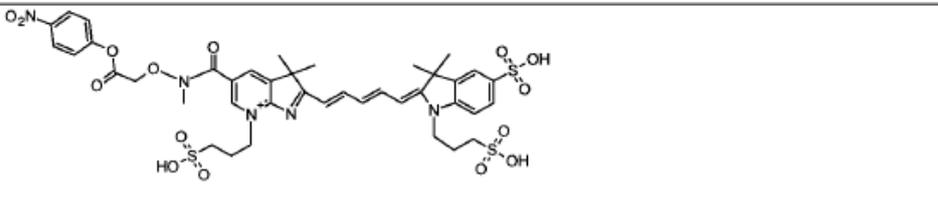
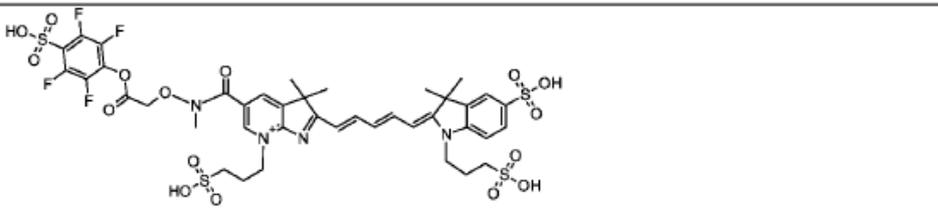
Tinte	Estructura
12	
22	
24	
26	
29	
33	

<p>34</p>	
<p>35</p>	
<p>40</p>	
<p>41</p>	
<p>42</p>	
<p>45</p>	

<p>46</p>	
<p>47</p>	
<p>48</p>	
<p>49</p>	
<p>50</p>	
<p>51</p>	

52	
53	
54	
55	
60	
61	

62	
63	
64	
65	
66	
67	
68	

69	
70	
71	
72	
73	
74	
75	

76	
77	
78	
79	
80	
81	
82	
83	

5 Muchas realizaciones de los compuestos y conjugados de la invención poseen una carga electrónica global. Se entenderá que cuando tales cargas electrónicas se muestren presentes, están en equilibrio mediante la presencia de contraiones adecuados, que pueden o no identificarse explícitamente. Un contraión compatible biológicamente, que se prefiere para algunas aplicaciones, no es tóxico para aplicaciones biológicas, y no tiene un efecto sustancialmente perjudicial para las biomoléculas. Cuando el compuesto de la invención esté cargado positivamente, el contraión se selecciona normalmente de, pero no se limita a, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, alcanosulfato, arilsulfonato, fosfato, perclorato, tetrafluoroborato, tetraarilboruro, nitrato y aniones de ácidos carboxílicos alifáticos o aromáticos.

5 Cuando el compuesto de la invención está cargado negativamente, el contraión se selecciona normalmente de, pero no se limita a, iones de un metal alcalino, iones de un metal alcalinotérreo, iones metálicos de transición, iones de amonio o amonio sustituido o piridinio. Preferiblemente, cualquier contraión necesario es compatible biológicamente, no es tóxico cuando se emplea, y no tiene efecto sustancialmente perjudicial en las biomoléculas. Los contraiones se cargan fácilmente mediante métodos bien conocidos en la técnica, tal como por cromatografía por intercambio iónico, o precipitación selectiva.

10 Se entenderá que los tintes de la invención se han extraído en una u otra estructura de resonancia electrónica particular. Cada aspecto de la presente invención se aplica igualmente a los tintes que se han extraído formalmente con otras estructuras de resonancia permitidas, según la carga electrónica en los tintes de la invención se deslocaliza a través del propio tinte.

#### Síntesis de Tintes Reactivos

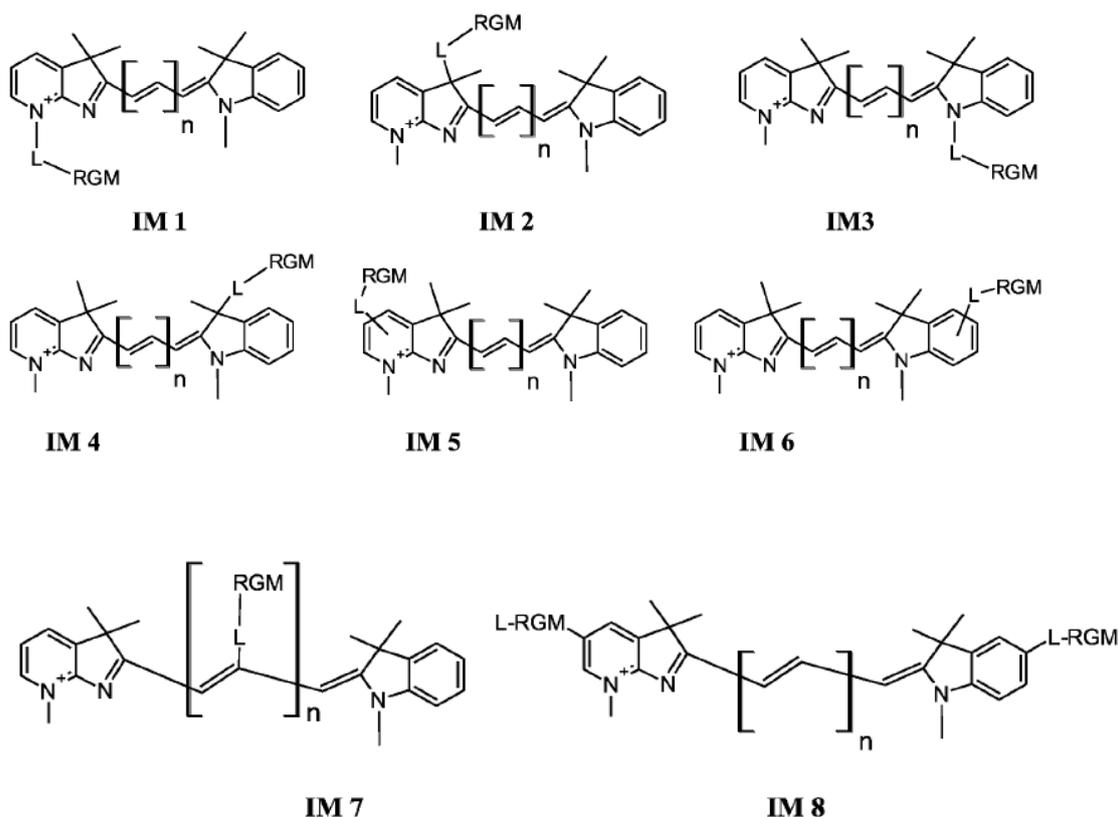
15 Están disponibles muchas referencias generales que proporcionan normalmente esquemas de síntesis química, y condiciones útiles conocidas para sintetizar los compuestos de tinte que se describen (véase, por ejemplo, Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Quinta Edición, Wiley-Interscience, 2001; o Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, Cuarta Edición, Nueva York: Longman, 1978). Están disponibles referencias generales que proporcionan métodos para la preparación de nucleósidos análogos (véase, por ejemplo, el análisis de "Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry" Eds. Zorbach y Tipson, Wiley, Nueva York 1973, Vol. 1 y 2).

20 Los compuestos de tintes como se describen en la presente memoria, se pueden purificar mediante cualquier protocolo de purificación conocido en la técnica, que incluyen la cromatografía, tal como HPLC, cromatografía en capa fina, cromatografía en columna rápida y cromatografía de intercambio iónico. Se puede emplear cualquier fase estacionaria adecuada, incluyendo las fases normal e inversa, así como resinas iónicas. En determinadas realizaciones, los compuestos descritos se purifican a través de cromatografía en sílica gel y/o alúmina. Véase, por ejemplo, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª Edición, ed. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, John Wiley e Hijos, 1979; and *Thin Layer Chromatography*, ed E. Stahl, Springer-Verlag, Nueva York, 1969.

25 Durante cualquiera de los procesos para la preparación de los compuestos de tinte de la invención, puede ser necesario y/o deseable proteger los grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas correspondientes. Esto se puede conseguir por medios convencionales mediante grupos protectores, como se describen en trabajos estandarizados, tales como J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Tercera edición, Wiley, Nueva York 1999, en "The Peptides"; Volumen 3 (editores: E. Gross y J. Meienhofer), Academic Press, Londres y Nueva York 1981, en "Methoden der organischen Chemie", Houben-Weyl, 4ª edición, Vol. 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, en H.-D. Jakubke y H. Jescheit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, y Basel 1982, y/o en Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Los grupos protectores se pueden eliminar en una etapa posterior adecuada empleando métodos conocidos en la técnica.

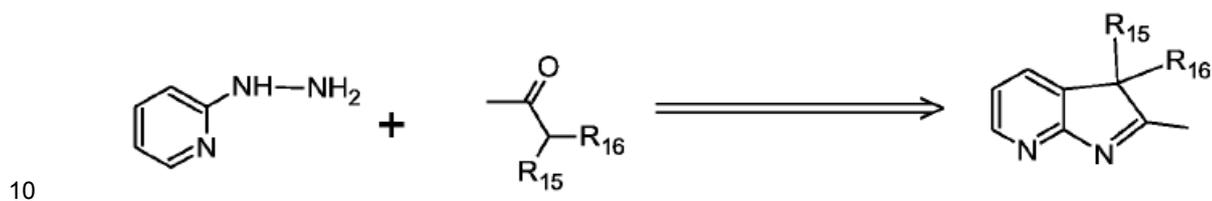
30 Los compuestos de tinte de la invención se pueden sintetizar a través de una variedad de rutas sintéticas diferentes utilizando materiales de inicio y/o materiales de inicio preparados disponibles comercialmente, mediante cualquier método sintético adecuado. Ejemplos de métodos que se pueden adaptar para sintetizar los compuestos descritos en la presente memoria, se describen a continuación. Los expertos en la técnica serán también capaces de adaptar fácilmente estos métodos para la síntesis de cualquiera de los compuestos específicos, como se describen en la presente memoria.

35 Se puede utilizar en la preparación de los compuestos de tintes de la invención, cualquier método adecuado en la química orgánica y heterocíclica. La síntesis de los compuestos de tinte de la invención se puede conseguir a través de la preparación inicial de determinados intermedios. Algunos intermedios de interés tienen las siguientes estructuras generales (para simplificar, sólo se muestran como hidrógeno algunos de los posibles sustituyentes de tales estructuras):



Esquema 1. Estructuras intermedias de los compuestos de tinte reactivo que muestran posiciones RGM de interés

Estas estructuras se pueden sustituir además opcionalmente, durante o después de la síntesis, para proporcionar los sustituyentes de tintes correspondientes, como se definen anteriormente. Para las carbocianinas, los intermedios de indolina se pueden sintetizar fácilmente mediante una reacción que es análoga a la síntesis de indol de Fischer (véase, Sundberg RJ, THE CHEMISTRY OF INDOLES, *Organic chemistry, a series of monographs*, 1970, Academic Press) como se muestra en el Esquema 2. En algunos casos, la síntesis de las diferentes carbocianinas sustituidas se consigue empleando esquemas como los que se ilustran en las Figuras 5-7.



Esquema 2. Síntesis de intermedios de azaindolina

La síntesis de tintes de cianina de la invención, cuando tiene un grupo RGM unido a un anillo de azaindolina, un anillo de indol o el enlazador polimetino, se pueden conseguir bien a través de la preparación inicial del intermedio de indolina correspondiente, o bien a través de la postmodificación de carbocianinas a través de transformaciones del grupo funcional común (Larock, "Comprehensive Organic Transformations", 1999, John Wiley e Hijos). Las indolinas se pueden transformar fácilmente a las carbocianinas deseadas siguiendo cualquier método adecuado. Por ejemplo, NN'-difenilformamida, trietilortoformato, malonaldehído bis(fenilimina) hidrocloreto, 1,1,3-trimetoxipropano, 1,1,3,3-tetrametoxipropano y glutaconaldehído dianilmonocloruro, son intermedios adecuados empleados en la síntesis de carbocianinas. Ejemplos de carbocianinas que tienen enlaces dobles conjugados se describen en la Patente de E.E.U.U. N° 5.831.098 de Ollmann, Jr (1998); Patente de E.E.U.U. N° 6.086.737 de Patonay, et al. (2002); Patente de E.E.U.U. N° 6.048.982 de Waggoner (2000); y la Patente de E.E.U.U. N° 5.453.505 de Lee, et al. (1995); Patente de E.E.U.U. N° 5.639.874 de Middendorf, et al. (1997); Patente de E.E.U.U. N° 3.864.644 de Lincoln, et al. (1975); Patente de E.E.U.U. N° 4.011.086 de Simson (1977).

Para la síntesis de carbocianinas, una hidrazina arilo sustituida (para simplificar, se muestran como hidrógeno sólo algunos de los posibles sustituyentes), que puede ser una piridinahidrazina sustituida, reacciona con una metilcetona sustituida para producir un derivado 2-metilindol 3,3-disustituido (véase el Esquema 2). Es posible utilizar un derivado piridinahidrazina sulfonado o un derivado de quinolinahidrazina para aumentar la solubilidad del tinte final.

La 2-metilazaindolina 3,3-disustituida se cuaterniza después en el átomo de nitrógeno hasta un derivado de piridinio con un agente alquilante que puede ser un haluro de alquilo, tal como yoduro de etilo, un alquilsulfonato, tal como metil p-toluenosulfonato o un sulfonato cíclico, tal como propanosulfato o propanosulfona o butanosulfona. En algunos casos, la azaindolina o benzoazaindolina intermedios clave, se sulfonan una o más veces antes o después de la cuaternización, y condensación posterior con el resto de indol y el resto de polimetino, para formar los tintes de la invención. Se pueden emplear variaciones de estos métodos que producen sustituyentes en el puente de polimetino o en la porción de indol o azaindolina del tinte precursor. Véase, por ejemplo, Leung W, et al., WO 02/26891; Brooker, et al., J. AM. CHEM. SOC., 64, 199 (1942); Chu-Moyer, et al., J. ORG. CHEM., 60, 5721 (1995); Turner, J. ORG. CHEM., 48, 3401 (1983); Couture, et al., J. HETEROCYCLIC CHEM., 24, 1765 (1987); Petric, et al. J. HETEROCYCLIC CHEM. 14, 1045, (1977); Barlin, et al. AUST. J. CHEM., 37, 1729 (1984); Saikachi et al. CHEM. & PHARM. BULL., 9, 941 (1961); Barlin, AUST. J. CHEM., 36, 983 (1983); Foye et al., J. PHARM. SCI., 64, 1371 (1975) Khanna, et al. J. ORG. CHEM., 60, 960 (1995)); Patente Británica N° 870.753 de Ficken, et al. (1961).

En algunos casos, la síntesis de los tintes de la invención implica tres precursores: la sal de benzazolio o azabenzazolio adecuada, y una fuente para el separador de polimetino. Normalmente cada componente se selecciona para incorporar los sustituyentes químicos deseados, o grupos funcionales (por ejemplo, RGM) que se pueden convertir en los sustituyentes adecuados. Se pueden emplear una variedad de químicas y materiales para preparar y combinar estos precursores para producir cualquiera de los compuestos de tinte de la invención.

Se reconoce que existen muchas variaciones posibles que pueden producir resultados equivalentes. Los sustituyentes en los carbonos aromáticos del resto de azabenzazolio, se pueden incorporar en la molécula matriz de aza- o poliazabenzazol antes de la cuaternización con un agente alquilante. Sin embargo, tales sustituyentes se pueden incorporar durante la síntesis del resto de azabenzazol. Pueden estar ya presentes sustituyentes alquilo, alcoxilo, carboxilo, y halógeno en los carbonos aromáticos como sustituyentes en los precursores de benzazol o azabenzazol, o en compuestos que se convierten fácilmente en tales precursores empleando cualquier método adecuado. Se pueden introducir grupos de ácido sulfónico en los precursores antes de la condensación del tinte de cianina [véase, por ejemplo, la Patente de E.E.U.U N° 5.767.287 de Bobrow, et al. (1998)]. Los grupos aminoalquilo pueden contener un grupo protector cuando se introducen primero, por ejemplo, mediante la sustitución en el precursor de benzazol o azabenzazol. El grupo protector se puede eliminar a continuación, después de la condensación del tinte de cianina. Los grupos amino aromáticos se pueden preparar a través de la reducción del precursor de benzazolio sustituido con nitrógeno, que se prepara a su vez mediante la nitración del precursor de benzazol.

Para la síntesis de tintes que contienen una variedad de grupos reactivos, tales como los que se describen en la Tabla 3, se puede emplear cualquier método adecuado. En algunos casos, tintes reactivos con amina, tales como los "ésteres activados" de ácidos carboxílicos, se pueden sintetizar mediante acoplamiento de un ácido carboxílico con un "grupo saliente" relativamente ácido. Otros grupos reactivos con amina de interés incluyen, pero no se limitan a, haluros de sulfonilo, que se pueden preparar a partir de ácidos sulfónicos empleando un agente halogenado, tal como  $PCl_5$  o  $POCl_3$ ; halotriazinas, que se pueden preparar mediante la reacción de haluros cainúricos con aminas; e isocianatos o isotiocianatos, que se pueden preparar a partir de aminas y fosgeno o tiofosgeno, respectivamente.

Los tintes que contienen aminas e hidrazidas son útiles para la conjugación con ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas. En algunos casos, se sintetizan mediante la reacción de un éster activado de un ácido carboxílico o un haluro sulfonilo con una diamina, tal como cadaverina, o con una hidrazina. Alternativamente, se pueden sintetizar aminas aromáticas mediante reducción química de un compuesto nitroaromático. Las aminas e hidrazinas son precursores útiles para la síntesis de halogenoacetamidas o maleimidias reactivas con tiol mediante cualquier método adecuado.

Los nucleósidos y nucleótidos marcados con tintes de la invención son útiles para algunas aplicaciones de marcaje de ácidos nucleicos. En algunos casos, se emplean amidatos de carbocianina para el marcaje de nucleótidos y nucleósidos empleando métodos similares a los descritos por la Patente de E.E.U.U. N° 5.986.086 de Brush, et al. (1999); la Patente de E.E.U.U. N° 5.808.044 de Brush, et al. (1998); y la Patente de E.E.U.U. N° 5.556.959 de Brush, et al. (1996).

#### Conjugados de Tinte

La presente divulgación proporciona conjugados. Por "conjugado" se entiende un primer resto que se asocia de forma estable con un segundo resto. Por "que se asocia de forma estable" se entiende que un resto se une a otro resto o estructura bajo condiciones estándar. En determinadas realizaciones, el primer y segundo restos se unen a otro a través de uno o más enlaces covalentes. En algunos casos, los tintes de la invención se asocian a un sustrato a través de uno o más grupos reactivos químicamente (RGM) para producir un conjugado de tinte. Los tintes reactivos de la invención pueden reaccionar con una amplia variedad de sustratos que contienen o se modifican para contener grupos funcionales adecuados, dando como resultado una conjugación del tinte con la sustancia.

Como sustrato en los conjugados de tinte de la invención, se puede emplear cualquier sustancia adecuada (por ejemplo, sustratos orgánicos o inorgánicos). En algunos casos, el sustrato es un biopolímero. Los sustratos de interés incluyen un aminoácido, un péptido, una proteína, una tiramina, un polisacárido, un resto complejante de

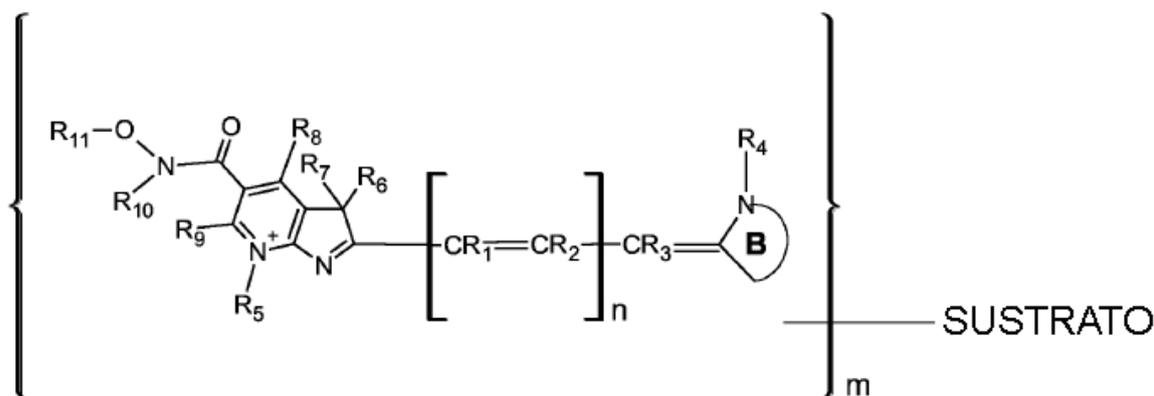
iones, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un anticuerpo o fragmento o derivado de anticuerpo, un hapteno, un psoraleno, un fármaco, una hormona, un lípido, un conjunto lipídico, un polímero, una micropartícula polimérica, una célula biológica o virus, como se describen con más detalle a continuación. Conjugados de tinte útiles incluyen también, pero no se limitan a, conjugados donde el sustrato es un aminoácido, un nucleótido, un biopolímero (por ejemplo, polímero aminoacídico, polímero de ácido nucleico, polisacárido, carbohidrato o lípido), un antígeno, esteroide, vitamina, fármaco, hapteno, metabolito, toxina, contaminante medioambiental, resto complejante de iones o vidrio, plástico, u otro polímero no biológico. En algunas realizaciones, el sustrato es una célula, sistema celular, fragmento o componente celular, o partícula subcelular (por ejemplo, una partícula vírica, partícula bacteriana, o un componente de las mismas), una partícula de un virus, una partícula bacteriana, un componente vírico, una célula biológica (tal como una célula animal, célula vegetal, bacteria, levadura, o protista), o un componente celular. Se pueden emplear también tintes reactivos para marcar grupos funcionales en la superficie celular, en membranas celulares, orgánulos, o citoplasma.

En determinados casos, los conjugados son conjugados de R-ficoeritrina y aloficocianina con tintes seleccionados de la invención que sirven como aceptores o donadores del estado excitado de energía. En estos conjugados, la transferencia del estado excitado de energía da como resultado una emisión fluorescente en una longitud de onda más larga cuando se excita a longitudes de onda relativamente cortas.

En algunas realizaciones, el conjugado de tinte es un conjugado de tinte de cinanina-azaindolina sustituido con hidroxamato, donde el conjugado incluye un grupo 5-hidroxamato-azaindolina unido a un anillo de 5 miembros a través de un grupo de unión de polimetino divalente, en donde uno o más de los grupos de 5-hidroxamato-azaindolina, del grupo de unión de polimetino divalente. y del anillo heterocíclico de 5 miembros se conjuga con el sustrato.

En algunos casos, el conjugado de tinte incluye un tinte (por ejemplo, como se describe anteriormente), de una fórmula de I a VI, donde el RGM se conjuga con el sustrato de interés para producir el conjugado. En determinadas realizaciones, el tinte bioconjugado se prepara mediante asociación a un compuesto de tinte de una de las Fórmulas de I, II, III, IV, V o VI, con un anticuerpo.

En algunos casos, el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula VII:



Fórmula VII

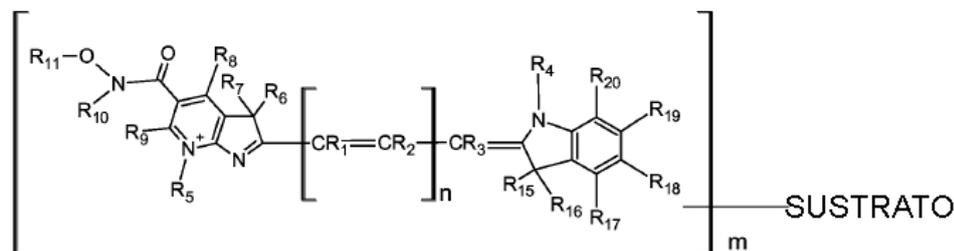
donde B, n y R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub>, son como se describe anteriormente para la Fórmula I, excepto que RGM es un sustrato, y m es de 1 a 50.

En determinados casos, en la Fórmula VII, el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno e incluye además, de cero a tres anillos aromáticos fusionados; donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros, y de los cero a tres anillos aromáticos fusionados, se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo), N(acilo) y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros, y los cero a tres anillos aromáticos, se sustituyen opcionalmente con uno o más sustituyentes que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, y un L-SUSTRATO.

En determinadas realizaciones, en la fórmula VII, m es 1 a 50, tal como 3 a 35, 6 a 35, 10 a 35 ó 15 a 20. En algunos casos, de 1 a aproximadamente 50 moléculas de tinte se conjugan al SUSTRATO, tal como de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 6 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, o aproximadamente 15 a 20 moléculas de tinte por

- 5 SUSTRATO. En algunas realizaciones, se pueden conjugar aproximadamente 35 moléculas de tinte al SUSTRATO sin auto-apagamiento significativo. En determinados casos, m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50. En determinados casos, m es aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50.
- En algunas realizaciones, en la Fórmula VII, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula VII, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula VII, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula VII, n es 3.
- 10 En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula VII, dos de los R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula VII, uno de los R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-SUSTRATO.
- 15 En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO.
- 20 En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con un o más sustituyentes que se seleccionan de un SUSTRATO, un sulfonato, un fosfato, amino, amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO.
- 25 En determinados casos, en la Fórmula VII, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula VII, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula VII, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula VII, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son un metilo cada uno. En algunas realizaciones, R<sub>6</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>7</sub> es un L-SUSTRATO. En algunas realizaciones, R<sub>7</sub> es el L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO).
- 30 En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un fosfonilo, o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones, R<sub>9</sub> se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.
- 35 En algunas realizaciones, en la Fórmula VII, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente, un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula VII, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo o L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula VII, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula VII, R<sub>10</sub> es L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula VII, R<sub>11</sub> es L-SUSTRATO.
- En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. En determinados casos, el SUSTRATO es una molécula biológica, bien un ligando bioactivo pequeño, o bien un biopolímero.
- 45 En determinadas realizaciones, en la Fórmula VII, en uno o más de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> se incluye un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula VII, en dos de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> se incluye un L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula VII, se incluye un L-SUSTRATO.

En algunas realizaciones, el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula VIII:



Fórmula VIII

5 donde  $n$  y  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{20}$ , son como se describe anteriormente para la Fórmula II, excepto que RGM es un sustrato, y  $m$  es de 1 a 50.

10 En determinadas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $m$  es de 1 a 50, tal como de 3 a 35, 6 a 35, 10 a 35 ó 15 a 20. En algunos casos, de 1 a aproximadamente 50 moléculas de tinte se conjugan al SUSTRATO, tal como aproximadamente 3 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 6 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, o aproximadamente 15 a aproximadamente 20 moléculas de tinte por SUSTRATO. En algunas realizaciones, se pueden conjugar aproximadamente 35 moléculas de tinte al SUSTRATO sin auto-apagamiento significativo. En determinados casos,  $m$  es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50. En determinados casos,  $m$  es aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50.

15 En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_1$ - $R_3$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un alquilamino, un arilamino, un tioalquilo, un tiolarilo, un ariloxilo, o un L-SUSTRATO;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{20}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un halógeno, sulfonato, o un L-SUSTRATO;  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO.

25 En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_1$ - $R_3$  son un hidrógeno cada uno;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{20}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, sulfonato, o un L-SUSTRATO; y  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

30 En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_1$ - $R_3$  son un hidrógeno cada uno;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{17}$ ,  $R_{19}$  y  $R_{20}$  son un hidrógeno cada uno;  $R_{18}$  es sulfonato;  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

35 En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $L$  es nulo, es un alquilo, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo. En algunas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $L$  es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

En algunas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $n$  es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $n$  es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $n$  es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $n$  es 3.

40 En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_1$ - $R_3$  son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos,  $R_1$ - $R_3$  son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula VIII, dos de los  $R_1$ - $R_3$  se unen ciclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula VIII, uno de los  $R_1$ - $R_3$ , es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-SUSTRATO.

45 En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de un

alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un SUSTRATO, un sulfonato, un fosfato, un amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y SUSTRATO.

- 5 En algunas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_6$  y  $R_7$  son un metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son un metilo cada uno. En algunas realizaciones,  $R_6$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_7$  es L-SUSTRATO. En algunas realizaciones,  $R_7$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y SUSTRATO). En algunas realizaciones,  $R_{15}$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_{16}$  es L-SUSTRATO. En algunas realizaciones,  $R_{16}$  es L-Z (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y SUSTRATO).

- 20 En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{20}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcóxido que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{20}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos en la Fórmula VIII,  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{20}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_8$  y  $R_9$  son un hidrógeno cada uno. En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_{17}$ - $R_{20}$  son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones,  $R_9$  se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.

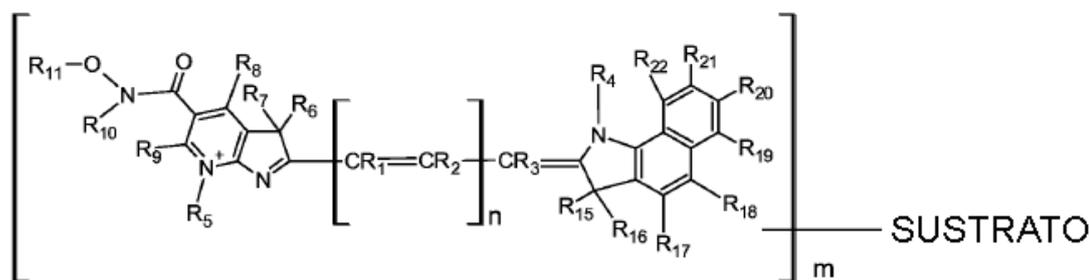
- 25 En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula VIII,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo o L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula VIII,  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc.). En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_{10}$  es L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula VIII,  $R_{11}$  es L-SUSTRATO.

Uno o más de  $R_4$  y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_8$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{20}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como un anillo de 5, 6, 7 ó 8 miembros).

- 35 En algunos casos,  $L$  es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. En determinados casos, el SUSTRATO es una molécula biológica, bien un pequeño ligando bioactivo, o bien un biopolímero.

En determinadas realizaciones, en la Fórmula VIII, uno o más de los  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{20}$  incluye un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula VIII, dos de los  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{20}$  incluyen un L-SUSTRATO.

En algunas realizaciones, el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula IX:



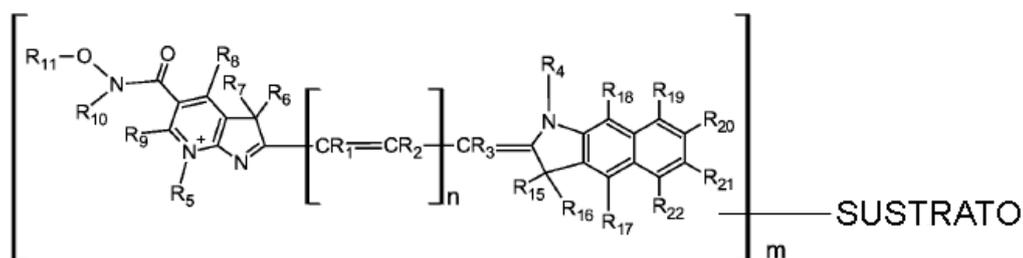
- 40 Fórmula IX

donde  $n$  y  $R_1$ - $R_{11}$  y  $R_{15}$ - $R_{22}$ , son como se describe anteriormente para la Fórmula III, excepto que RGM es un sustrato, y  $m$  es de 1 a 50.

- 45 En determinadas realizaciones, en la Fórmula IX,  $m$  es de 1 a 50, tal como 3 a 35, 6 a 35, 10 a 35 o 15 a 20. En algunos casos, de 1 a aproximadamente 50 moléculas de tinte se conjugan al SUSTRATO, tal como aproximadamente 3 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 6 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, o aproximadamente 15 a

- aproximadamente 20 moléculas de tinte por SUSTRATO. En algunas realizaciones, se pueden conjugar aproximadamente 35 moléculas de tinte al SUSTRATO sin auto-apagamiento significativo. En determinados casos, m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50. En determinados casos, m es aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50.
- En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, n es 3.
- En determinados casos, en la Fórmula IX, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula IX, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula IX, dos de los R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IX, uno de los R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-RGM.
- En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IX, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula IX, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un RGM, un sulfonato, un fosfato, amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM.
- En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son un metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son un metilo cada uno. En algunas realizaciones, R<sub>6</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>7</sub> es L-RGM. En algunas realizaciones, R<sub>7</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM). En algunas realizaciones, R<sub>15</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>16</sub> es L-RGM. En algunas realizaciones, R<sub>16</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y RGM).
- En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno o L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son un hidrógeno cada uno. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones, R<sub>9</sub> se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.
- En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IX, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo o un L-RGM. En algunos casos, en la Fórmula IX, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula IX, R<sub>10</sub> es L-RGM. En determinados casos, en la Fórmula IX, R<sub>11</sub> es L-RGM.
- En algunas realizaciones, en la Fórmula IX, uno o más R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como 5, 6, 7 ó 8 miembros).
- En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. En determinados casos, el SUSTRATO es una molécula biológica, bien un ligando bioactivo pequeño, o bien un polímero.
- En algunos casos, en la Fórmula IX, al menos uno de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>20</sub> incluye un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula IX, dos de los R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub> incluyen un L-SUSTRATO.

En algunas realizaciones, el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula X:



Fórmula X

5 donde n y R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub>, son como se describe en la Fórmula IV, excepto que RGM es un sustrato, y m es de 1 a 50.

En determinadas realizaciones, en la Fórmula X, m es de 1 a 50, tal como de 3 a 35, 6 a 35, 10 a 35 ó 15 a 20. En algunos casos, de 1 a aproximadamente 50 moléculas de tinte se conjugan al SUSTRATO, tal como aproximadamente 3 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 6 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, o aproximadamente 15 a aproximadamente 20 moléculas de tinte por SUSTRATO. En algunas realizaciones, se pueden conjugar aproximadamente 35 moléculas de tinte al SUSTRATO sin auto-apagamiento significativo. En determinados casos, m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50. En determinados casos, m es aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50.

15 En algunas realizaciones, en la Fórmula X, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula X, n es 1. En algunas realizaciones, en la Fórmula X, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula X, n es 3.

En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula X, dos de R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula X, uno de R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-SUSTRATO.

25 En algunas realizaciones, en la Fórmula X, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula X, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula X, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un SUSTRATO, un sulfonato, un fosfato, amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO.

35 En algunas realizaciones, en la Fórmula X, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son un metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son un metilo cada uno. En algunas realizaciones, R<sub>6</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>7</sub> es L-SUSTRATO. En algunas realizaciones, R<sub>7</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO). En algunas realizaciones, R<sub>15</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>16</sub> es L-SUSTRATO. En algunas realizaciones, R<sub>16</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO).

45 En algunas realizaciones, en la Fórmula X, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula X, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula X, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno o L-SUSTRATO. En algunos casos,

en la Fórmula X, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son un hidrógeno cada uno. En algunos casos, en la Fórmula X, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones, R<sub>9</sub> se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.

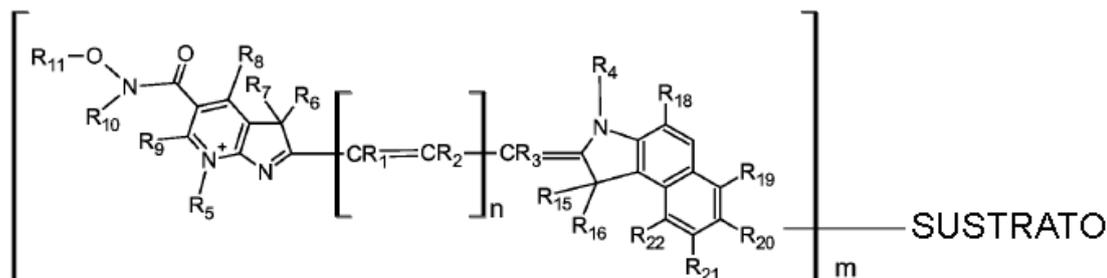
5 En algunas realizaciones, en la Fórmula X, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula X, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula X, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>10</sub> es L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>11</sub> es L-SUSTRATO.

10 En algunas realizaciones, en la Fórmula X, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como 5, 6, 7 ó 8 miembros).

En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. En determinados casos, el SUSTRATO es una molécula biológica, bien un ligando bioactivo pequeño, o bien un biopolímero.

15 En algunos casos, en la Fórmula X, al menos uno de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub> incluye un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula X, dos de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub> incluyen un L-SUSTRATO.

En algunas realizaciones, el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula XI:



Fórmula XI

20 donde n y R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub>, son como se describe en la Fórmula V, excepto que RGM es un sustrato, y m es de 1 a 50.

En determinadas realizaciones, en la Fórmula XI, m es de 1 a 50, tal como de 3 a 35, 6 a 35, 10 a 35 ó 15 a 20. En algunos casos, de 1 a aproximadamente 50 moléculas de tinte se conjugan al SUSTRATO, tal como aproximadamente 3 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 6 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, o aproximadamente 15 a aproximadamente 20 moléculas de tinte por SUSTRATO. En algunas realizaciones, se pueden conjugar aproximadamente 35 moléculas de tinte al SUSTRATO sin auto-extinción significativa. En determinados casos, m es 25 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50. En determinados casos, m es aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50.

30 En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, o un L-SUSTRATO; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO; R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un sulfonato o un L-SUSTRATO; y R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO.

En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno; R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO; R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, o un sulfonato; y R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

En algunos casos, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. En determinados casos, el SUSTRATO es bien una molécula biológica, bien un ligando bioactivo pequeño, o un biopolímero.

45 En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, n es 0. En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, n es 1. En algunas

realizaciones, en la Fórmula XI, n es 2. En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, n es 3.

En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula XI, dos de R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula XI, uno de los R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-SUSTRATO.

En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula XI, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un SUSTRATO, un sulfonato, un fosfato, amino, un animo sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan cada uno independientemente de -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO.

En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son un metilo cada uno. En determinados casos, en la Fórmula X, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son un metilo cada uno. En algunas realizaciones, R<sub>6</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>7</sub> es L-SUSTRATO. En algunas realizaciones, R<sub>7</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO). En algunas realizaciones R<sub>15</sub> es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y R<sub>16</sub> es L-SUSTRATO. En algunas realizaciones, R<sub>16</sub> es L-Z (por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Z, donde m es 1-12 y Z se selecciona de -H, -CO<sub>2</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H y SUSTRATO).

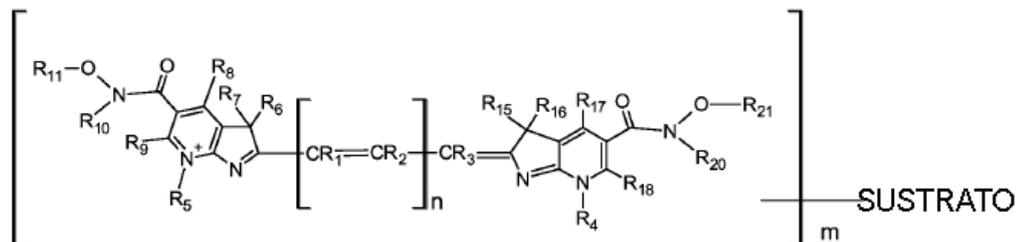
En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son independientemente un hidrógeno o L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son un hidrógeno cada uno. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones, R<sub>9</sub> se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.

En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula XI, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, un alquilo, un arilo o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula XI, R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, tal como un alquilo bajo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, etc). En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>10</sub> es L-SUSTRATO. En determinados casos, en la Fórmula XI, R<sub>11</sub> es L-SUSTRATO.

En algunas realizaciones, en la Fórmula XI, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros (por ejemplo, un anillo de 5 a 12 miembros, tal como un anillo de 5, 6, 7 ó 8 miembros).

En algunos casos, en la Fórmula XI, al menos uno de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub> incluye un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula XI, dos de R<sub>1</sub>-R<sub>11</sub> y R<sub>15</sub>-R<sub>22</sub> incluyen un L-SUSTRATO.

En determinadas realizaciones, el conjugado es un compuesto de Fórmula XII:



Fórmula XII

donde  $n$  y  $R_1$ - $R_{11}$ ,  $R_{15}$ - $R_{18}$ ,  $R_{20}$  y  $R_{21}$ , son como se describe en la Fórmula VI, excepto que RGM es un sustrato, y  $m$  es de 1 a 50.

5 En algunos casos, en la Fórmula XII,  $m$  es de 1 a 50, tal como de 3 a 35, 6 a 35, 10 a 35 ó 15 a 20. En algunos casos, de 1 a aproximadamente 50 moléculas de tinte se conjugan al SUSTRATO, tal como aproximadamente 3 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 6 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, o aproximadamente 15 a aproximadamente 20 moléculas de tinte por SUSTRATO. En algunas realizaciones, se pueden conjugar aproximadamente 35 moléculas de tinte al SUSTRATO sin auto-extinción significativa. En determinados casos,  $m$  es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ó 50. En determinados casos,  $m$  es aproximadamente 5, aproximadamente 10, 10 aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50.

15 En determinados casos, en la Fórmula XII,  $R_1$ - $R_3$  son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_4$  y  $R_5$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxiarilo, o un L-SUSTRATO;  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;  $R_{10}$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{20}$  y  $R_{21}$  son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfonilalquilo, o un L-SUSTRATO;  $L$  es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte; el SUSTRATO es una molécula biológica, bien un pequeño ligando bioactivo, o bien un biopolímero; uno o más de  $R_4$  y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_8$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{18}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  se podrían tomar en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

25 En determinados casos,  $R_1$ - $R_3$  son un hidrógeno cada uno. En determinados casos, en la Fórmula XII, dos de los  $R_1$ - $R_3$  se unen cíclicamente para formar un anillo carbociclo o heterociclo de seis miembros. En determinadas realizaciones, en la Fórmula XII, uno de los  $R_1$ - $R_3$  es un alcoxilo, un ariloxilo, o un L-SUSTRATO.

30 En algunos casos, en la Fórmula XII,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de un alquilo que tiene 1-20 carbonos, donde el alquilo se puede sustituir con uno o más sustituyentes que se seleccionan de un SUSTRATO, un sulfonato, un fosfato, amino, un amino sustituido, un amonio, un carboxilo, y un hidroxilo. En determinadas realizaciones,  $R_4$  y  $R_5$  se seleccionan cada uno independientemente de  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y SUSTRATO.

35 En determinados casos, en la Fórmula XII,  $R_6$  y  $R_7$  son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En determinados casos, en la Fórmula XII,  $R_6$  y  $R_7$  son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos, en la Fórmula XII,  $R_6$  y  $R_7$  son un metilo cada uno. En algunas realizaciones,  $R_6$  es un alquilo bajo (por ejemplo, un metilo o un etilo) y  $R_7$  es  $L-Z$  (por ejemplo,  $-(CH_2)_m-Z$ , donde  $m$  es 1-12 y  $Z$  se selecciona de  $-H$ ,  $-CO_2H$ ,  $-NH_2$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H$  y SUSTRATO).

40 En algunos casos, en la Fórmula XII,  $R_8$  y  $R_9$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula XII,  $R_8$  y  $R_9$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula XII,  $R_8$  y  $R_9$  son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones,  $R_9$  se une cíclicamente al N adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.

45 En algunos casos, en la Fórmula XII,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o un alquilo que tiene 1-20 carbonos. En algunos casos, en la Fórmula XII,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son cada uno independientemente un hidrógeno o L-SUSTRATO. En algunos casos, en la Fórmula XII,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son un hidrógeno cada uno. En determinadas realizaciones,  $R_{18}$  se une cíclicamente al N-R4 adyacente del anillo de azaindolina para formar, por ejemplo, un anillo de 6 miembros.

50 En determinados casos, en la Fórmula XII,  $R_1$ - $R_3$  son cada uno independientemente un hidrógeno, o un L-SUSTRATO;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_8$ ,  $R_9$  y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un sulfonato, un fosfonilo o un L-SUSTRATO; y  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO.

55 En determinados casos, en la Fórmula XII,  $R_1$ - $R_3$  son un hidrógeno cada uno;  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;  $R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{17}$  y  $R_{18}$  son cada uno

independientemente un hidrógeno, o un sulfonato; y  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

En determinados casos, en la Fórmula XII, L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol. En determinados casos, el SUSTRATO es una molécula biológica, tal como un pequeño ligando bioactivo, o un biopolímero.

- 5 En algunos casos, en la Fórmula XII, n es 0. En algunos casos, en la Fórmula XII, n es 1. En determinados casos, en la Fórmula XII, n es 2. En algunos casos, en la Fórmula XII, n es 3.

En determinadas realizaciones, en la Fórmula XII, uno o más de  $R_1$ -  $R_{11}$ ,  $R_{15}$ - $R_{18}$  y  $R_{20}$ - $R_{21}$  incluye un L-SUSTRATO. En determinadas realizaciones, en la Fórmula XII, dos de  $R_1$ -  $R_{11}$ ,  $R_{15}$ - $R_{18}$  y  $R_{20}$ - $R_{21}$  incluye un L-SUSTRATO.

- 10 En algunas realizaciones, el tinte conjugado se deriva de la conjugación de cualquiera de los tintes reactivos de la Tabla 1 con un grupo funcional compatible de un sustrato de interés (por ejemplo, como se describe en la presente memoria).

En algunas realizaciones, en el conjugado de tinte,  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente  $-(CH_2)_q-Z$ , en donde Z es un grupo soluble en agua y q es un número entero de 1 a 12. En determinadas realizaciones, Z es  $SO_3H$  y n es 3.

- 15 En algunas realizaciones, en el conjugado de tinte,  $R_{15}$  es un alquilo bajo y  $R_{16}$  es  $-(CH_2)_mY-RGM$ , donde Y es un cicloalquilo, un heterocicloalquilo, un heterociclo, o un arilo y m es 0 o un número entero de 1 a 6. En algunos casos, Y es un fenilo, un piridilo, un ciclohexilo, o un piperidinilo. En determinadas realizaciones,  $R_{15}$  es metilo. En determinados casos, RGM es un éster activo. En algunos casos, Y es fenilo. En determinadas realizaciones,  $R_{16}$  es  $-(CH_2)_m-Ph-C(O)-NHS$ , donde m es 0 ó 1 y NHS es N-hidroxilo succinimidilo.

- 20 En determinados casos, en el conjugado de tinte,  $R_6$  y  $R_7$  son cada uno independientemente un alquilo bajo. En determinados casos,  $R_6$  y  $R_7$  son un metilo cada uno.

En determinadas realizaciones, el conjugado de tinte no incluye un sustituyente que contiene PEG. En determinadas realizaciones el conjugado de tinte no incluye un polímero óxido polialquileno soluble en agua de PM 300 a 5000.

En determinadas realizaciones, el conjugado de tinte no incluye un enlazador separador. En determinadas realizaciones, el conjugado de tinte no incluye un enlazador que incluya un grupo  $-C=N$  lábil.

- 25 En determinadas realizaciones, el conjugado es un conjugado polipéptido, que incluye un polipéptido conjugado a un compuesto de tinte (por ejemplo, como se describe anteriormente). El tinte de interés se puede conjugar al polipéptido en cualquier sitio que se desee del polipéptido. Por tanto, la presente divulgación proporciona, por ejemplo, un polipéptido modificado que tiene un tinte conjugado en un sitio o cerca del C-terminal del polipéptido. Otros ejemplos incluyen un polipéptido modificado que tiene un tinte conjugado en una posición en o cerca del N-terminal del polipéptido. Ejemplos incluyen también un polipéptido modificado que tiene un tinte conjugado en una posición entre el C-terminal y el N-terminal del polipéptido (por ejemplo, en un sitio interno del polipéptido). También son posibles combinaciones de lo anterior donde el polipéptido modificado se conjuga con dos o más tintes.

- 35 Realizaciones de la presente divulgación incluyen conjugados donde un polipéptido se conjuga con uno o más tintes, tal como 2 tintes, 3 tintes, 4 tintes, 5 tintes, 6 tintes, 7 tintes, 8 tintes, 9 tintes, o 10 tintes o más. Los tintes se pueden conjugar con el polipéptido en uno o más sitios en el polipéptido. Por ejemplo, se pueden conjugar uno o más tintes a un único resto de aminoácido del polipéptido. En algunos casos, se conjuga un tinte a un resto aminoácido del polipéptido. En otras realizaciones, se pueden conjugar dos tintes al mismo resto aminoácido del polipéptido. En otras realizaciones, un primer tinte se conjuga a un primer resto aminoácido del polipéptido y un segundo tinte se conjuga a un segundo resto aminoácido del polipéptido. También son posibles combinaciones de lo anterior, por ejemplo cuando se conjuga un polipéptido a un primer tinte en un primer resto aminoácido y se conjuga a otros dos tintes en un segundo resto aminoácido. También son posibles otras combinaciones, tales como, pero no se limitan a, un polipéptido conjugado a un primer y segundo tinte en un primer resto aminoácido y conjugado a un tercero y cuatro restos en el segundo resto aminoácido, etc. En algunos casos, el polipéptido es un anticuerpo.

- 45 En algunas realizaciones, los conjugados de tinte encuentran uso en ensayos biológicos, donde el sustrato puede ser un aminoácido, un nucleótido, o un biopolímero, tal como un polímero aminoácido, un polímero de ácido nucleico, un carbohidrato, o un polisacárido. Se pueden preparar conjugados de tinte-polímero que se incorporan a una pluralidad de moléculas de tinte conjugadas a un sustrato para incrementar la señal fluorescente del conjugado-tinte.

- 50 En algunas realizaciones, el sustrato es un aminoácido o un polímero aminoácido, tal como un péptido o una proteína. Polímeros aminoácidos de interés incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (por ejemplo, como se define anteriormente), proteínas de unión a IgG (por ejemplo, proteína A, proteína G, proteína A/G, etc), enzimas, lectinas, glicoproteínas, histonas, albúminas, lipoproteínas, avidina, estreptavidina, proteína A, proteína G, ficobiliproteínas y otras proteínas fluorescentes, hormonas, toxinas, quimoquinas, factores de crecimiento, neuropéptidos, citoquinas, sustratos de proteasa, y sustratos de proteína quinasa. En determinadas realizaciones, el sustrato biopolímero es un anticuerpo monoclonal.

55

En determinadas realizaciones, el sustrato es una base de ácido nucleico, nucleósido, nucleótido o un polímero de ácido nucleico. Polímeros de ácidos nucleicos de interés incluyen, pero no se limitan a, los que se modifican por poseer un enlazador o separador adicional para la unión de los tintes de la invención, tales como un enlace alquinilo (véase por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N° 5.047.519), un enlace aminoalilo (véase por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N° 4.711.955), un enlazador de un heteroátomo sustituido (véase por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N° 5.684.142), u otro enlace. En algunas realizaciones, la sustancia conjugada es un nucleósido o nucleótido análogo que une una base de purina o pirimidina a un resto fosfato o polifosfato a través de un separador no cíclico. En determinadas realizaciones, el tinte se conjuga a la porción de carbohidrato de un nucleótido o nucleósido, por ejemplo, a través de un grupo hidroxilo o a través de un tiol o grupo amino (por ejemplo, como se describe en las Patentes de E.E.U.U. N°s 5.659.025; 5.668.268; 5.679.785). En algunos casos, el nucleótido conjugado es un nucleósido trifosfato o un desoxinucleósido trifosfato o un didesoxinucleósido trifosfato. La incorporación de restos de metileno o de heteroátomos de nitrógeno o azufre al resto fosfato o polifosfato, es también útil. Se pueden acoplar también con los compuestos de tinte de la invención bases no purínicas y no pirimidínicas, tales como 7-desazapurinas (véase por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N° 6.150.510) y de ácidos nucleicos que contienen tales bases. Los aductos de ácido nucleico preparados mediante la reacción de ácidos nucleicos despurinados con derivados de amina, hidrazina o hidroxilamina proporcionan medios adicionales de marcaje y detección de ácidos nucleicos, véase por ejemplo "A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent in base excision repair". Atamna et al., 2000, Proc Natl Acad Sci 97: 686-691.

Los conjugados de polímero de ácido nucleico de interés incluyen, pero no se limitan a, ADN o ARN marcados, monocatenarios o multcatenarios, naturales o sintéticos, oligonucleótidos de ADN o ARN, o híbridos de ADN/ARN, o ácidos nucleicos que incorporan un enlazador inusual, tal como fosfatos derivados de morfolina, o ácidos peptidonucleicos, tal como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. Cuando el ácido nucleico es un oligonucleótido sintético, pueden contener menos de 50 nucleótidos, por ejemplo, menos de 25 nucleótidos. Los conjugados de los ácidos peptidonucleicos (APN) (véase por ejemplo, Nielsen et al Patente de E.E.U.U. N° 5.539.082) se pueden emplear para algunas aplicaciones debido a que sus velocidades de hibridación generalmente son más rápidas.

En algunas realizaciones el sustrato es un carbohidrato que es un polisacárido, tal como un dextrano, heparina, glucógeno, amilopectina, manano, inulina, almidón, agarosa o celulosa. Alternativamente, el carbohidrato es un polisacárido que es un lipopolisacárido. Conjugados polisacáridos de interés incluyen, pero no se limitan a, dextrano y conjugados de lipopolisacárido.

En determinadas realizaciones, el sustrato es un lípido (por ejemplo, que tiene 6-60 carbonos), que incluyen glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, y esteroides. Alternativamente, la sustancia conjugada es un conjunto de lípidos, tal como un liposoma. El resto lipofílico se puede emplear para retener las sustancias conjugadas en las células, por ejemplo, como se describe en la Patente de E.E.U.U. N° 5.208.148. Determinados tintes polares de la invención se pueden atrapar también dentro de conjuntos lipídicos.

Los conjugados en los cuales el sustrato es un resto complejante de iones, pueden servir como indicadores de calcio, sodio, magnesio, zinc, potasio, u otros iones metálicos importantes biológicamente. Restos complejantes de iones de interés incluyen, pero no se limitan a, éteres de corona (véase por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N° 5.405.975); derivados de ácido 1,2-bis-(2-aminofenoxietano)-N,N,N',N'-tetraacético (quelantes BAPTA; véanse por ejemplo, las Patentes de E.E.U.U. N°s 5.453.517, 5.516.911, y 5.049.673); derivados de ácido 2-carboximetoxianilino-N,N-diacético (véase por ejemplo, quelantes APTRA; Am. J. Physiol. 256, C540 (1989)); quelantes basados en iones metálicos de piridina y fenantrolina (véase por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N° 5.648.270); y derivados del ácido nitrilotriacético, véase por ejemplo "Single-step synthesis and characterization of biotinylated nitrilotriacetic acid, a unique reagent for detection of histidine-tagged proteins immobilized on nitrocellulose", McMahan et al., 1996, Anal Biochem 236:101-106. El resto complejante de iones puede ser un quelante de éter corona, un quelante BAPTA, un quelante APTRA, o un derivado del ácido nitrilotriacético.

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

En algunas realizaciones, los conjugados de tinte se marcan además con al menos un segundo tinte, el cual es opcionalmente un tinte adicional de la presente invención. En determinadas realizaciones, el primer y segundo tinte forman un par de transferencia de energía, por ejemplo, una transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET, de sus siglas en inglés). En algunos aspectos de la invención, el conjugado marcado funciona como un sustrato enzimático, y la hidrólisis enzimática interrumpe la transferencia de energía.

En algunos casos, los conjugados de tinte fluorescente, particularmente cuando el sustrato es un biopolímero,

pueden incorporar múltiples tintes por molécula de sustrato para incrementar la señal fluorescente. En algunos casos, 3 o más moléculas de tintes se incorporan dentro de los conjugados biopolímero-tinte. En algunas realizaciones en las que el biopolímero es un anticuerpo, se conjugan tres o más, tal como 4 o más, 5 o más, o 6 o más moléculas de tinte, con el anticuerpo. En algunos casos, de 1 a aproximadamente 50 moléculas de tinte, se conjugan con el anticuerpo, tal como de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 6 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, aproximadamente 10 a aproximadamente 35 moléculas de tinte, o aproximadamente 15 a aproximadamente 20 moléculas de tinte por anticuerpo. En algunas realizaciones, aproximadamente 35 moléculas de tinte se pueden conjugar al anticuerpo sin auto-apagamiento significativo. Se entenderá por el experto en la técnica que cada intervalo indicado de tintes por sustrato de conjugado se destina a describir todos los valores dentro del intervalo. Estableciendo por tanto, por ejemplo, que los polímeros fluorescentes de la invención que contienen 6-15 moléculas de tinte, biopolímeros que contienen 6, 7, 8, ..., o 15 moléculas de tinte también son parte de la invención. Se entenderá que los intervalos y valores establecidos de los tintes por conjugado que se describen en la presente memoria, pueden ser un valor medio.

El sustrato y el compuesto del tinte de la invención (por ejemplo, como se describe anteriormente) se pueden conjugar el uno al otro a través de un resto de acoplamiento. En algunos casos, el sustrato y el compuesto del tinte de la invención se pueden unir (por ejemplo, unidos covalentemente) al resto de acoplamiento, uniendo, por tanto, indirectamente el sustrato y el compuesto de tinte. En algunos casos, el resto de acoplamiento incluye el producto de una reacción de conjugación entre un RGM del compuesto del tinte y un grupo funcional compatible del sustrato. El sustrato puede contener tal grupo o grupos funcionales o se puede modificar para contener tales grupos funcionales con reactividad adecuada, dando como resultado una unión química del tinte a la sustancia. En algunos casos, la reacción de conjugación entre el tinte reactivo y el grupo o grupos funcionales sobre el sustrato da como resultado uno o más átomos del grupo reactivo RGM que se incorporan dentro de un nuevo enlace (por ejemplo, resto de acoplamiento) que une el tinte al sustrato.

En algunos casos, el sustrato es un aminoácido, un péptido, una proteína, una tiramina, un polisacárido, un resto complejante de iones, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un hapteno, un psoraleno, un fármaco, una hormona, un lípido, un conjunto de lípidos, un polímero, una micropartícula polimérica, una célula biológica o virus. En algunos casos, el sustrato es un péptido, una proteína, un nucleótido, un oligonucleótido, o un ácido nucleico. Cuando se conjugan tintes de la invención a tales biopolímeros, es posible incorporar más tintes por molécula para incrementar la señal fluorescente. En determinados casos, es posible incorporar tres o más moléculas de tales tintes por molécula de anticuerpo sin perder fluorescencia total, si bien la fluorescencia espectral comparable con Cy5 (en donde  $n=2$ ) se extingue fuertemente cuando se incorporan más de aproximadamente dos tintes Cy5 por anticuerpo. En algunos casos, los conjugados marcados de la invención son más fluorescentes que los conjugados de espectros similares de los tintes de cianina tal como Alexa Fluor® 700 a la misma concentración de anticuerpo.

En algunas realizaciones, el sustrato es un aminoácido (tal como aminoácidos que se protegen o sustituyen por fosfonatos, carbohidratos, o ácidos carboxílicos de  $C_1$  a  $C_{25}$ ), o es un polímero de aminoácidos tal como un péptido o una proteína. En determinadas realizaciones, los conjugados del péptido contienen al menos cinco aminoácidos, tal como de 5 a 36 aminoácidos. Péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, neuropéptidos, citoquinas, toxinas, sustratos de proteasa, y sustratos de proteína quinasa. Conjugados de proteína de interés incluyen enzimas, anticuerpos, lectinas, glicoproteínas, histonas, albúminas, lipoproteínas, avidina, estreptavidina, proteína A, proteína G, fibobiliproteínas y otras proteínas fluorescentes, hormonas, toxinas, quimoquinas y factores de crecimiento.

En algunos casos, la proteína conjugada es una fibobiliproteína, tal como alofocianina, ficocianina, ficoeritrina, alofocianina B, B-ficoeritrina, y ficoeritrocianina (por ejemplo, véase la Patente de E.E.U.U. Nº 5.714.386 de Roederer (1998)). En determinados casos, los conjugados son conjugados de R-ficoeritrina y de alofocianina (APC) con tintes seleccionados de la invención que sirven como aceptores o donares del estado excitado de energía. En estos conjugados, la transferencia de energía del estado excitado da como resultado una mayor longitud de onda de emisión fluorescente cuando se excita a longitudes de onda relativamente cortas.

En algunas realizaciones, el conjugado de tinte es parte de un conjugado en tándem con un segundo sustrato. Un conjugado en tándem puede incluir un tinte conjugado a un fluorocromo (por ejemplo, una proteína fluorescente, tal como una fibobiliproteína) donde el conjugado tinte-fluorocromo se conjuga además a un sustrato de interés. En algunas realizaciones, el conjugado tinte-fluorocromo es un conjugado de tinte-APC. En determinadas realizaciones, el conjugado de tinte-APC se conjuga a un miembro de un par de unión específico, por ejemplo, como se describe en la Tabla 2. En algunos casos, el conjugado en tándem es un conjugado tinte-APC-anticuerpo. En determinadas realizaciones, el conjugado tinte-APC incluye uno o más restos del grupo reactivo para conjugarse a un sustrato de interés. Como tal, en algunos casos, el conjugado tinte-APC se puede referir como un tinte reactivo (por ejemplo, como se describe en la presente memoria). En la preparación de los conjugados en tándem de la invención se puede emplear cualquier método adecuado.

En un aspecto de la invención, el sustrato es un sustancia conjugada que es un anticuerpo (que incluye anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpo, suero de anticuerpo, etc.), un aminoácido, una angiostatina o endostatina, una avidina o estreptavidina, una biotina (por ejemplo una amidobiotina, una biocitina, una destiobiotina, etc.), una proteína componente de la sangre (por ejemplo, una albúmina, un fibrinógeno, un plasminógeno, etc), un dextrano,

una enzima, un inhibidor enzimático, una proteína de unión a IgG (por ejemplo, una proteína A, proteína G, proteína A/G, etc), una proteína fluorescente (por ejemplo una ficobiliproteína, una aequolina, una proteína fluorescente verde, etc.), un factor de crecimiento, una hormona, una lectina (por ejemplo, una aglutinina de germen de trigo, una concanavalina A, etc.), un lipopolisacárido, una proteína de unión a metal (por ejemplo, una calmodulina, etc.), un microorganismo o porción del mismo (por ejemplo una bacteria, un virus, una levadura, etc.), un neuropéptido y otros factores activos biológicamente (por ejemplo una dermorfina, una deltopina, una endomorfin, una endorfina, un factor de necrosis tumoral, etc.), una micropartícula no biológica (por ejemplo de ferrofluido, oro, poliestireno, etc.), un nucleótido, un oligonucleótido, una toxina peptídica (por ejemplo, una apamina, una bungarotoxina, una faloidina, etc.), una proteína de unión a fosfolípido (por ejemplo una anexina, etc.), un fármaco de molécula pequeña (por ejemplo un metotrexato, etc), una proteína estructural (por ejemplo una actina, una fibronectina, una laminina, una proteína asociada a microtúbulo, una tubulina, etc), o una tiramida.

Preparación de Conjugados de Tinte

Los conjugados de tinte de la presente invención se pueden sintetizar como el producto de una reacción entre un sustrato y un tinte de la invención (por ejemplo, como se describe en la presente memoria). En la preparación de los conjugados de tinte de la invención se puede emplear una variedad de grupos reactivos químicamente (RGM) y de sustratos compatibles, y químicas de bioconjugación (véase por ejemplo, Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, Academic Press, Nueva York, 3ª Ed., 2013). La preparación de conjugados de tinte empleando tintes reactivos se puede conseguir empleando cualquier método adecuado, véase, por ejemplo, Hermanson, ibid; Haugland, 1995, Methods Mol. Biol. 45:205-21; y Brinkley, 1992, Bioconjugate Chemistry 3:2. Los conjugados pueden ser el resultado de mezclar tintes reactivos apropiados y el sustrato a conjugar en un disolvente adecuado en el que ambos son solubles. Las disoluciones de los tintes reactivos que se describen en la presente memoria se crean fácilmente, facilitando las reacciones de conjugación con cualquier sustrato adecuado. Para los tintes reactivos que están fotoactivados, la conjugación se puede alcanzar a través de la iluminación de la mezcla de reacción para activar el tinte reactivo.

Los conjugados de tinte se pueden sintetizar como el producto de una reacción entre un biopolímero y el tinte reactivo, en donde las condiciones de reacción dan como resultado la conjugación de múltiples moléculas de tinte a cada biopolímero. En algunos casos, los conjugados biopolímeros de tinte se pueden sintetizar como una reacción de polimerización de subunidades de moléculas, en donde una o más subunidades de moléculas se han conjugado al tinte reactivo antes de la polimerización del biopolímero. Un ejemplo del último método es la síntesis de oligonucleótidos empleando la química fosforamidita convencional, donde al menos una fosforamidita se marca con un tinte.

En algunos casos, un grupo reactivo químicamente es un electrófilo o nucleófilo que puede formar un enlace covalente a través de la exposición a un grupo funcional correspondiente que es un nucleófilo o electrófilo, respectivamente. Algunos ejemplos de pares reactivos de grupos electrofílicos y nucleofílicos, junto con el enlace covalente resultante de su reacción, se muestran en la Tabla 3, de a continuación.

Tabla 3: Grupos Reactivos Electrofílicos y Nucleofílicos, y los Restos de Acoplamiento Resultantes

Grupo Electrofílico	Grupo Nucleofílico	Conjugado Resultante
ésteres activados*	aminas/anilinas	carboxamidas
acrilamidas	tioles	tioéteres
acilazidas**	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de acilo	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de acilo	alcoholes/fenoles	ésteres
acilnitrilos	alcoholes/fenoles	ésteres
acilnitrilos	aminas/anilinas	carboxamidas
aldehídos	aminas/anilinas	iminas
aldehídos o cetonas	hidrazinas	hidrazonas
aldehídos o cetonas	hidroxilaminas	oximas
haluros de alquilo	aminas/anilinas	alquilaminas
haluros de alquilo	ácidos carboxílicos	ésteres

ES 2 628 529 T3

haluros de alquilo	tioles	tioéteres
haluros de alquilo	alcoholes/fenoles	éteres
alquilsulfonatos	tioles	tioéteres
alquilsulfonatos	ácidos carboxílicos	ésteres
alquilsulfonatos	alcoholes/fenoles	éteres
anhídridos	alcoholes/fenoles	ésteres
anhídridos	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de arilo	tioles	tiofenoles
haluros de arilo	aminas	arilaminas
aziridinas	tioles	tioéteres
boronatos	glicoles	ésteres boronato
carbodiimidas	añadidos carboxílicos	N-acilureas o anhídridos
diazoalcanos	ácidos carboxílicos	ésteres
epóxidos	tioles	tioéteres
halogenoacetamidas	tioles	tioéteres
halogenoplatinato	amino	complejo de platino
halogenoplatinato	heterociclo	complejo de platino
halogenoplatinato	tiol	complejo de platino
halotriazinas	aminas/anilinas	aminotriazinas
halotriazinas	alcoholes/fenoles	triaziniléteres
imidoésteres	aminas/anilinas	amidinas
isocianatos	aminas/anilinas	ureas
isocianatos	alcoholes/fenoles	uretanos
isotiocianatos	aminas/anilinas	tioureas
maleimidas	tioles	tioéteres
fosforamiditas	alcoholes	ésteres de fosfito
haluros de sililo	alcoholes	sililéteres
ésteres sulfonato	aminas/anilinas	alquilaminas
ésteres sulfonato	tioles	tioéteres
ésteres sulfonato	ácidos carboxílicos	ésteres
ésteres sulfonato	alcoholes	éteres
haluros de sulfonilo	aminas/anilinas	sulfonamidas
haluros de sulfonilo	fenoles/alcoholes	ésteres sulfonato

\*Los ésteres activados, pueden tener la fórmula  $-COW$ , donde W es un buen grupo saliente (por ejemplo succinimidiloxilo  $(-OC_4H_4O_2)$ , sulfosuccinimidiloxilo  $(-OC_4H_3O_2-SO_3H)$ , 1-oxibenzotriazolilo  $(-OC_6H_4N_3)$ ; o un grupo ariloxilo o ariloxilo sustituido uno o más veces por sustituyentes que retiran electrones, tales como nitro, fluoro, cloro, ciano, o trifluorometilo, o combinaciones de los mismos, empleados para formar arilésteres activados; o un ácido

carboxílico activado por una carbodiimida para formar un anhídrido o anhídrido mixto  $-\text{OCOAlk}$  o  $-\text{OCN(Alk}_1\text{)NH(Alk}_2\text{)}$ , donde  $\text{Alk}_1$  y  $\text{Alk}_2$ , que pueden ser iguales o diferentes, son alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ , perfluoroalquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ , o alcóxido  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ ; o ciclohexilo, 3-dimetilaminopropilo, o N-morfolinoetilo). \*\* Las acilazidas también pueden transponerse a isocianatos.

- 5 La elección del grupo reactivo que se emplea para unir el tinte a un sustrato para conjugar, puede depender del grupo funcional de la sustancia para conjugar y, del tipo o longitud del enlace covalente deseado. Los tipos de grupos funcionales que se pueden presentar en el sustrato orgánico o inorgánico incluyen, pero no se limitan a, aminas, amidas, tioles, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, fosfatos, imidazoles, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas disustituidas, haluros, epóxidos, ésteres de carboxilato, ésteres de sulfonato, purinas, pirimidinas, ácidos carboxílicos, enlaces olefínicos, o una combinación de estos grupos. Puede estar disponible en el sustrato un solo tipo de sitio reactivo (por ejemplo, como puede ocurrir para polisacáridos), o pueden aparecer una variedad de sitios (por ejemplo, aminas, tioles, alcoholes, fenoles), por ejemplo, como puede ocurrir para las proteínas. Un sustrato conjugado se puede conjugar a más de un tinte, que puede ser el mismo o diferente, o con un sustrato que se modifica adicionalmente mediante cualquier resto adecuado (por ejemplo, mediante un hapteno, tal como biotina).
- 10 En algunos casos, la selectividad se puede obtener mediante un cuidadoso control de las condiciones de reacción. En algunos casos, la selectividad del marcaje se puede obtener mediante la selección de un tinte reactivo adecuado.

En algunos casos, el grupo reactivo, RGM, reacciona con una amina, un tiol, un alcohol, un aldehído o una cetona. En determinados casos, el RGM reacciona con una amina o un grupo funcional tiol. En determinadas realizaciones, el RGM es una acrilamida, una amina reactiva (incluyendo una cadaverina o etilendiamina), un éster activado de un ácido carboxílico (por ejemplo, un éster de succinimidilo de un ácido carboxílico), una acilazida, un acilnitrilo, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, una anilina, un haluro de arilo, una azida, una aziridina, un boronato, un ácido carboxílico, un diazoalcano, una halogenoacetamida, una halogenotriazina, una hidrazina (incluyendo hidrazidas), un imidoéster, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, una fosforamidita, un complejo de platino reactivo, un haluro de sulfonilo, o un grupo tiol. Se entiende particularmente por "complejo de platino reactivo" los complejos de platino químicamente reactivos, tal como se describen en las Patentes de E.E.U.U. N<sup>os</sup> 5.580.990; 5.714.327; 5.985.566.

30 Cuando RGM es un éster activado de un ácido carboxílico, el tinte reactivo puede ser útil para preparar conjugados de tinte de proteínas, nucleótidos, oligonucleótidos, o haptenos. Cuando RGM es una maleimida o halogenoacetamida, el tinte reactivo puede ser útil para la conjugación con sustancias que contienen tiol. Cuando RGM es una hidrazida, el tinte reactivo puede ser útil para la conjugación de carbohidratos oxidados con peryodato y glicoproteínas, y, además, pueden ser un marcador polar fijable a aldehído para microinyección celular. En algunos casos, el RGM es un ácido carboxílico, un éster succinimidilo de un ácido carboxílico, una halogenoacetamida, una hidrazina, un isotiocianato, un grupo maleimida, una amina alifática, un perfluorobenzamido, un grupo azidoperfluorobenzamido, o un psoraleno. En determinados casos, el RGM es un éster de succinimidilo de un ácido carboxílico, una maleimida, una yodoacetamida, o un complejo de platino reactivo. Alternativamente, el grupo reactivo, RGM, es un grupo fotoactivable en cuyo caso el tinte se vuelve reactivo químicamente sólo después de la iluminación con luz de una longitud de onda apropiada. En algunos casos, el grupo reactivo es un grupo fotoactivable, tal como una azida, diazirinilo, azidoarilo, o derivado de psoraleno, y el tinte se vuelve reactivo químicamente sólo después de la iluminación con luz de una longitud de onda adecuada.

40 En determinadas realizaciones, los métodos de conjugación de sustrato biomolécula son compatibles con las condiciones de reacción adecuadas para la biomolécula. Por ejemplo, las condiciones de reacción pueden incluir una mezcla de reacción que incluye agua. En algunos casos, la mezcla de reacción puede tener un pH compatible con el polipéptido, tal como, pero se limita a, un pH de 4 a 11, o un pH de 5 a 10, o un pH de 6 a 9, o un pH de 6 a 8. En determinados casos, la mezcla de reacción tiene un pH de 7. En algunas realizaciones, las condiciones de reacción se realizan a una temperatura compatible con el polipéptido. Por ejemplo, las condiciones de reacción pueden ser a una temperatura de 20 °C hasta 45°C, tal como de 25°C a 40°C, o de 30°C hasta 40°C, o de 35°C hasta 40°C. En algunos casos, las condiciones de reacción son a temperatura ambiente (por ejemplo, 25 °C). En algunos casos, las condiciones de reacción son a una temperatura ambiente de 37 °C. Generalmente los expertos en la técnica apreciarán que factores tales como el pH y, el impedimento estérico (es decir, la accesibilidad del resto de aminoácido modificado para reaccionar con un compañero reactivo de interés) son de importancia. Las condiciones de la reacción de modificación para proporcionar condiciones de conjugación óptimas están dentro de la técnica del experto y es rutina en la técnica. Cuando la conjugación se realiza con un polipéptido presente en o sobre una célula viva, las condiciones se seleccionan para que sean compatibles fisiológicamente. Por ejemplo, el pH se puede reducir temporalmente durante un tiempo suficiente para permitir que ocurra la reacción pero dentro de un período tolerado por la célula (por ejemplo, desde aproximadamente 30 minutos a 1 hora). Las condiciones fisiológicas para realizar la modificación de polipéptidos en la superficie celular pueden ser similares a las que se emplean en una reacción cetona-azida en la modificación de células que soportan azidas en la superficie celular (véase, por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. N<sup>o</sup> 6.570.040).

60 En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un conjugado polipeptídico, donde el polipéptido es un anticuerpo. Como tal, realizaciones incluyen un anticuerpo conjugado a un resto de interés, donde un anticuerpo conjugado a un resto de interés se refiere como un "anticuerpo conjugado". Un polipéptido de Ig generalmente incluye al menos una región constante en la cadena pesada de Ig o una región constante en la

- cadena ligera de Ig, y puede incluir además una región variable de Ig (por ejemplo, una región  $V_L$  y/o una región  $V_H$ ). Las regiones constantes de Ig que incluyen regiones constantes de la cadena pesada Ig de cualquier cadena pesada del isótopo, aparecen de forma no natural en las regiones constantes de la cadena pesada de Ig (incluyendo el consenso de regiones constantes de cadena pesada Ig). Una región constante de Ig se puede modificar para que se conjugue con un resto de interés, donde el resto de interés se presenta en o adyacente a, una región en bucle accesible por el disolvente de la región constante de la Ig.
- En base a las características anteriormente mencionadas, los tintes reactivos de la invención se seleccionan para la preparación de los conjugados de tinte deseados, cuyas propiedades ventajosas les hacen útiles para una amplia variedad de aplicaciones.
- 10 Métodos
- Aspectos de la divulgación incluyen métodos de detección de un analito en una muestra. Poner en contacto la muestra con un reactivo de detección puede dar como resultado el marcaje del analito y, proporcionar la detección del analito mediante fluorescencia. En algunos casos, el analito se marca a través del acomplejamiento con el reactivo de detección. En determinados casos, el analito se marca a través de la conjugación con un reactivo de detección.
- 15 En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto la muestra con un reactivo de detección que comprende un conjugado de tinte (por ejemplo, como se describe en la presente memoria) bajo condiciones en las que el reactivo de detección forma un complejo con el analito. En determinadas realizaciones, la etapa de contacto ocurre bajo condiciones suficientes para que el reactivo de detección se una específicamente al analito.
- 20 En algunos casos, el reactivo de detección incluye un resto de unión específico que se une específicamente al analito. En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto la muestra con un reactivo de detección que comprende un tinte reactivo (por ejemplo, como se describe en la presente memoria) bajo condiciones en las que el reactivo de detección se conjuga con el analito.
- 25 Como se emplea en la presente memoria, los términos “analito” y “diana” se emplean de forma intercambiable y se refieren a cualquier sustancia que se vaya a analizar, detectar, medir, o marcar. Analitos de interés incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, hormonas, haptenos, antígenos, anticuerpos, receptores, enzimas, ácidos nucleicos, polisacáridos, químicos, polímeros, patógenos, toxinas, fármacos orgánicos, fármacos inorgánicos, células, tejidos, microorganismos, virus, bacterias, hongos, algas, parásitos, alérgenos, contaminantes, y combinaciones de los mismos.
- 30 Por convenio, cuando se tienen que detectar las células de un tipo celular dado, se pueden describir como un analito, tanto las moléculas del componente celular, como las propias células.
- Como se emplea en la presente memoria, el término “reactivo de detección” se refiere a cualquier molécula que se use para facilitar la detección óptica de un analito.
- 35 En algunos casos, el reactivo de detección incluye un tinte reactivo (por ejemplo, como se describe en la presente memoria) que es capaz de conjugarse con el analito de interés.
- En algunos casos, el reactivo de detección incluye un conjugado de tinte en el que el componente del sustrato del conjugado es, en sí mismo, un reactivo específico del analito. En algunos casos, el reactivo de detección incluye un reactivo específico del analito conjugado con un compuesto de tinte fluorescente (por ejemplo, como se describe en la presente memoria). En algunas realizaciones, el reactivo de detección incluye un reactivo específico del analito conjugado a un conjugado de tinte de una proteína fluorescente (por ejemplo, un conjugado en tándem). En determinados casos, el reactivo de detección incluye un conjugado de tinte que funciona como el marcador fluorescente y un reactivo específico del analito que se une al conjugado. En tales casos, el conjugado de tinte y el reactivo específico del analito se pueden unir entre sí covalentemente o no covalentemente a través de cualquier método adecuado.
- 40
- 45 Como se emplea en la presente memoria, los términos “reactivo específico del analito” y “reactivo específico diana” se emplean de forma intercambiable para referirse a cualquier reactivo que se une preferiblemente a un analito o diana de interés, en relación a otros analitos presentes potencialmente en una muestra. Una diana (analito) y reactivo específico de una diana (analito específico) pueden ser miembros de un par de unión específico (por ejemplo, restos de unión específicos), y cualquier miembro del par se puede emplear como el reactivo específico diana para unirse específicamente al otro miembro del par. Dianas y pares de reactivo específicos con la diana de interés incluyen, pero no se limitan a, los pares de reactivos que se proporcionan en la Tabla 2, de a continuación. En algunos casos, los reactivos específicos de la diana son anticuerpos que incluyen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (que inmunorreacciona con) a un antígeno.
- 50

Tabla 2: Pares de restos de unión específicos

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

Se puede emplear cualquier protocolo adecuado para poner en contacto la muestra con los compuestos o conjugados de tinte. El protocolo en particular que se emplea puede variar, por ejemplo, dependiendo de si la muestra es *in vitro* o *in vivo*, se emplea un compuesto de tinte o un conjugado de tinte. Para protocolos *in vitro*, el contacto de la muestra con el compuesto de tinte o con el conjugado de tinte, se puede conseguir empleando cualquier protocolo adecuado. En algunos casos, las muestras incluyen células que se mantienen en un medio de cultivo adecuado, y el compuesto de tinte o conjugado de tinte se introduce dentro del medio de cultivo. Para protocolos *in vivo*, se puede emplear cualquier protocolo adecuado de administración. Se pueden emplear varios protocolos dependiendo de la diana, la respuesta deseada, la forma de administración, por ejemplo, *i.v.*, *s.c.*, *i.p.*, oral, etc, la vida media, el número de células presentes. El término "muestra" como se emplea en la presente memoria, se refiere a un material o mezcla de materiales, normalmente, aunque no necesariamente, en forma de fluido, que contienen uno o más componentes de interés (por ejemplo, un analito).

En algunas realizaciones, el método sujeto incluye además la separación y purificación del analito marcado (por ejemplo, complejo reactivo de detección y analito, o analito marcado de tinte) de la muestra. Se puede emplear cualquier método adecuado en tales etapas de separación o purificación, que incluyen pero no se limitan a, citometría de flujo, citometría de escaneo, electroforesis en gel, electroforesis capilar, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de interacción hidrofóbica, filtración, extracción, métodos ELISA, y similares.

Los ensayos en los que se marcan uno o más analitos de interés empleando reactivos de detección específicos del analito y el análisis óptico posterior, son bien conocidos en la técnica, y los conjugados de tinte fluorescente presentes son generalmente útiles como reactivos de detección en tales ensayos. Por ejemplo, las proteínas en una muestra se pueden marcar empleando un reactivo de detección que consiste en una proteína marcada, normalmente un anticuerpo, que se une específicamente a la proteína analito. La detección de las proteínas analito marcadas resultantes se puede llevar a cabo empleando un número de formatos de ensayos e instrumentación bien conocidos, incluyendo la citometría de flujo, citometría de escaneo, obtención de imágenes, y análisis en gel. La citometría de flujo se describe detenidamente en la extensa bibliografía en este campo, incluyendo, por ejemplo, Landy et al. (eds.), *Clinical Flow Cytometry*, Annals of the New York Academy of Sciences Volumen 677 (1993); Bauer et al. (eds), *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*, William y Wilkins (1993); Ormerod (ed.), *Flow Cytometry: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press (1997); Jaroszeski et al. (eds.) *Flow Cytometry Protocols*, Methods in Molecular Biology N° 91, Humana Press (1997); y Practical Shapiro, *Flow Cytometry*, 4ª ed., Wiley-Liss (2003). La imagen con microscopio de fluorescencia se describe en, por ejemplo, Pawley (ed), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2ª edición, Plenum Press (1989).

Las fuentes de iluminación útiles para excitar los polímeros fluorescentes de la invención incluyen, pero no se limitan a, lámparas ultravioleta manuales, lámparas de arco de mercurio, lámparas de xenon, láseres y láseres de diodo. Estas fuentes de iluminación se integran opcionalmente dentro de escáneres láser, lectores de microplacas

fluorescentes, fluorómetros estándar o minis, o detectores de cromatografía. En algunos casos, los polímeros fluorescentes de la invención se excitan a, o cerca de, 633 nm, y se pueden excitar empleando una fuente de excitación de red láser relativamente económica.

5 Aspectos de la invención incluyen un sistema fluido analítico que incluye un instrumento que contiene una muestra que incluye un tinte o un conjugado de tinte, por ejemplo, como se describe en la presente memoria. Se puede emplear en los métodos de la invención cualquier instrumento o aparato que sea adecuado para cargar la muestra. Instrumentos de interés incluyen, pero no se limitan a, citómetros de flujo, citómetros de escaneo, generadores de imágenes, e instrumentos de análisis en gel. Se pueden cargar en los instrumentos de la invención cualquier muestra adecuada, por ejemplo, como se describe en la presente memoria, empleando cualquier método adecuado.

10 La muestra puede incluir uno o más componentes, tales como, un analito de interés, un tinte, o un conjugado de tinte, tal como un tinte-anticuerpo, un tinte-oligonucleótido, o una microesfera recubierta con un conjugado de proteína-tinte. En algunos casos, el instrumento es un citómetro de flujo cargado con una muestra que incluye un analito de interés y un conjugado de tinte.

#### Utilidad

15 Los compuestos de tinte, conjugados de los mismos y los métodos de la invención, por ejemplo, como se describe anteriormente, encuentran uso en una variedad de aplicaciones. Las aplicaciones de interés incluyen, pero no se limitan a: aplicaciones de investigación y aplicaciones de diagnóstico en una variedad de campos que incluyen la histología, citología e inmunología. Los métodos de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones diferentes que incluyen cualquier aplicación adecuada donde es de interés la detección y/o cuantificación por fluorescencia del analito de interés.

Los compuestos de tinte, conjugados y métodos de la invención, encuentran uso en una variedad de aplicaciones de diagnóstico e investigación. Las aplicaciones de diagnóstico de interés incluyen, pero no se limitan a, ensayos de diagnóstico para la identificación y separación de las subpoblaciones celulares en una mezcla de células por citometría de flujo, ensayos de diagnóstico empleando clasificación de células activadas por fluorescencia, y

25 microscopía de fluorescencia, ensayos de diagnóstico que implican la determinación de la concentración de los restos de unión (por ejemplo, unión antígeno-anticuerpo), y similares. Tales ensayos de diagnóstico pueden incluir la detección de analitos en las muestras, tales como sangre, orina y líquido cerebroespinal.

Los compuestos de tinte, conjugados y métodos de la invención, encuentran uso en una variedad de aplicaciones de investigación. Las aplicaciones de investigación de interés incluyen, pero no se limitan a, la detección de marcadores de la superficie celular, tales como, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD45, etc.

30

En un aspecto de la invención, los tintes reactivos se emplean para marcar directamente una muestra, o componentes de la muestra, para que la muestra se pueda identificar o cuantificar. Los compuestos de tinte reactivos químicamente se unen covalentemente a un grupo funcional correspondiente en una amplia variedad de materiales, formando conjugados de tinte, como se describen anteriormente.

35 En algunas realizaciones, los compuestos de tinte reactivos se emplean para teñir o marcar directamente muestras con componentes biológicos. La muestra puede comprender mezclas de componentes heterogéneos (que incluyen células intactas, extractos celulares, bacterias, virus, orgánulos, y mezclas de los mismos), o un solo componente o grupo de componentes homogéneos (por ejemplo, un aminoácido natural o sintético, polímeros de ácido nucleico o carbohidrato, o complejos de membrana lipídica). Estos tintes son generalmente no tóxicos para células vivas, y

40 otros componentes biológicos, dentro de la concentración de uso.

Para el marcaje directo, el compuesto de tinte se combina con la muestra en cualquier medio que facilite el contacto entre el compuesto de tinte y los componentes de la muestra de interés. En algunos casos, el compuesto de tinte o una disolución que tiene el compuesto de tinte, se añade simplemente a la muestra. Determinados tintes de la invención, tales como los que se sustituyen mediante uno o más restos de ácido sulfónico, suelen ser impermeables para las membranas de las células biológicas, y una vez dentro de las células viables, normalmente, se retienen bien. Se pueden emplear tratamientos para impermeabilizar las membranas plasmáticas, tales como, electroporación, tratamientos de choque o ATP extracelular elevado, para introducir dentro de las células compuestos de tinte seleccionados. Alternativamente, los compuestos de tinte seleccionados, se pueden introducir fisiológicamente dentro de las células, por ejemplo, mediante microinyección a presión, carga por raspado, métodos patch clamp (fijación de membranas), o fagocitosis.

45

50

Los tintes que incorporan una amina alifática o un resto hidrazina, se pueden microinyectar dentro de las células, donde se pueden fijar en su sitio mediante fijadores de aldehído, tales como, formaldehído o glutaraldehído. Esta fijación hace a estos tintes útiles para aplicaciones intracelulares, tales como el marcado neuronal.

Los compuestos de tinte que poseen un sustituyente lipofílico, tal como fosfolípidos, no se incorporarán covalentemente dentro de los conjuntos lipídicos, por ejemplo, para usar como sondas para la estructura de membrana; o para la incorporación en liposomas, lipoproteínas, películas, plásticos, microesferas lipofílicas o materiales similares; o para marcado. Los tintes lipofílicos son útiles como sondas fluorescentes de estructura de membrana.

55

Para la tinción directa de los analitos en aplicaciones biológicas, los compuestos de tinte de la invención se pueden usar en una disolución acuosa, principalmente acuosa o miscible en agua, preparada según métodos generalmente conocidos en la técnica. La concentración exacta del compuesto de tinte es dependiente de las condiciones experimentales y de los resultados deseados, pero pueden oscilar desde aproximadamente un nanomol hasta un milimol o más. La concentración óptima se determina mediante variación sistemática hasta que se consiguen resultados satisfactorios con una mínima fluorescencia de fondo.

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

#### 15 Ensayo y Kits de Ensayo de Tintes y Conjugados

Aspectos de la invención incluyen además kits, donde los kits incluyen uno o más componentes que se emplean en los métodos de la invención. Cualquiera de los componentes que se describen en la presente memoria se pueden proporcionar en los kits, por ejemplo, compuestos de tinte, conjugados de tinte, sustratos (por ejemplo, anticuerpo, biopolímero, polinucleótido), analitos, células, soportes (por ejemplo, membranas, perlas, partículas, películas, microesferas), restos de unión específicos (por ejemplo, como se describen en la Tabla 2), tampones, reactivos, reactivos de conjugación, fuente de luz, por ejemplo, como se describe en la presente memoria. Se pueden incluir una variedad de componentes adecuados para usar en la preparación y el uso de los conjugados. Los kits pueden incluir también tubos, tampones, etc, e instrucciones para el uso. Los diversos componentes reactivos de los kits se pueden presentar en recipientes separados, o algunos o todos ellos se pueden pre-combinar dentro de una mezcla reactiva en un único recipiente, como se desee. Los kits pueden contener además opcionalmente uno o más agentes tampón, que se presentan normalmente como una disolución acuosa. Los kits de la invención comprenden además reactivos de detección adicionales, un medio de purificación para purificar la sustancia marcada resultante, luminiscencia estándar, enzimas, inhibidores de enzimas, disolvente orgánico, o instrucciones para llevar a cabo un ensayo de la invención.

Un aspecto de la presente invención es la formulación de los kits que facilita la práctica de los diversos ensayos empleando cualquiera de los tintes de la invención, como se describe anteriormente. Los kits de la invención pueden comprender un tinte fluorescente de la invención, bien presente como un marcador reactivo químicamente, útil para la preparación de conjugados de tinte, o bien presente como un conjugado de tinte, donde la sustancia conjugada es un miembro del par de unión específico, o un nucleósido, nucleótido, oligonucleótido, polímero de ácido nucleico, péptido, o proteína. En algunos casos, el tinte se presenta como un conjugado en tándem (por ejemplo, como se describe en la presente memoria).

En algunas realizaciones, el kit comprende un compuesto de tinte reactivo que tiene la estructura de la Fórmula I, Fórmula II, Fórmula III, Fórmula IV, Fórmula V, o Fórmula VI (por ejemplo, como se describe anteriormente); y uno o más componentes que se seleccionan de un conjugado de tinte, un sustrato, un analito, una célula, un soporte, un resto de unión específico, un tampón, un reactivo, una fuente de luz e instrucciones para el uso de compuestos de tinte reactivo.

En determinadas realizaciones, el kit comprende un conjugado de tinte que tiene la estructura de la Fórmula VII, Fórmula VIII, Fórmula IX, Fórmula X, Fórmula XI, o Fórmula XII (por ejemplo, como se describe anteriormente); y uno o más componentes seleccionados de un compuesto de tinte, un sustrato, un analito, una célula, un soporte, un resto de unión específico, un tampón, un reactivo, una fuente de luz e instrucciones para el uso de compuestos de tinte reactivo. En determinados casos, el conjugado de tinte incluye un conjugado de tinte-APC.

En determinados casos, los kits de la invención pueden incluir además instrucciones para practicar los métodos de la invención. Estas instrucciones se pueden presentar en los kits de la invención en diferentes formas, se pueden presentar en el kit en una o más de ellas. Una forma en la que estas instrucciones se pueden presentar es como una información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, en un trozo o trozos de papel en los que se imprime la información, en el envase del kit, en el envase inserto, etc. Otra forma de estas instrucciones es un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, disco compacto (CD), disco duro, etc., en el que se ha grabado la información. Otra forma en la que se pueden presentar estas instrucciones es en una dirección web que se puede utilizar a través de internet para acceder a la información en un sitio aislado.

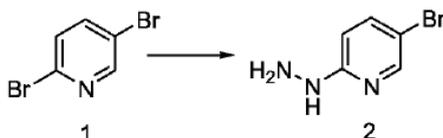
Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo realizar y usar la presente invención, y no se destinan a limitar o definir el alcance de lo que los inventores observan en su invención, no se destina a representar que los experimentos de continuación son todos o los únicos experimentos que se realizaron. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números empleados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deberían justificar algunos errores y

desviaciones experimentales. A menos que se indique de otra manera, partes son partes en peso, peso molecular es el peso medio molecular, la temperatura es en grados Centígrados, y la presión es a, o cerca de, la atmosférica.

### Ejemplos

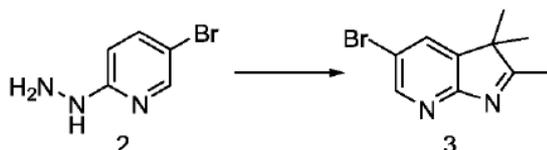
- 5 En los ejemplos de a continuación se proporcionan algunas estrategias sintéticas para los tintes de interés, así como su caracterización, precursores sintéticos, conjugados, y métodos de uso. Otras modificaciones y permutaciones serán evidentes para un experto en la técnica.

Ejemplo1. Preparación del Compuesto 2



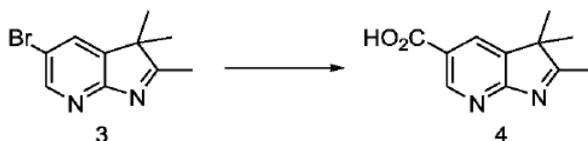
- 10 A una disolución de 2,5-dibromopiridina (10 g, 42 mmoles) en 1-butanol (50 mL), se añade hidrato de hidrazina (80%, 13 mL, 211 mmoles) a temperatura ambiente. Después de 6 horas a 115 °C, la mezcla se concentra hasta aproximadamente 15 mL. Se forma un sólido blanco y se recoge mediante filtración, se lava con 30 mL de agua fría. Después de secar al aire durante la noche, se obtiene el Compuesto 2 (8,0 g) como un sólido de color blanco.

Ejemplo 2. Preparación del Compuesto 3



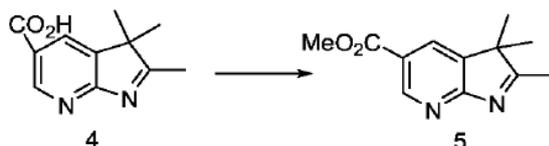
- 15 A una disolución del Compuesto 2 (20 g, 106 mmol) en benceno (100 mL), se añade 3-metil-2-butanona (22,9 mL, 212 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se mantuvo en reflujo durante la noche empleando un equipo condensador con un colector Dean-Stark. La mezcla se concentra, y el residuo se calienta en ácido polifosfórico (125 g) a 140 °C durante 45 minutos. La mezcla se echa en agua helada (500 M) con agitación. Se añade NaOH (5 N) para neutralizar la disolución hasta pH=8,0, y se extrae con EtOAc (500 mL). Después de secar en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , el residuo se purifica en una columna de sílica para proporcionar el Compuesto 3 (7,6 g) como un sólido amarillo.
- 20

Ejemplo 3. Preparación del Compuesto 4



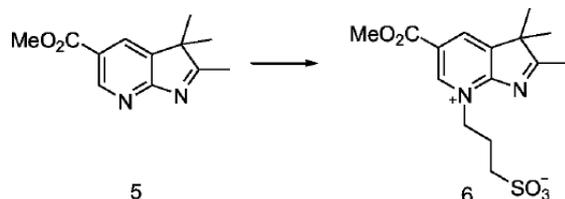
- 25 A una disolución del Compuesto 3 (2 g, 8,36 mmoles) en THF seco (40 mL) a -78 °C, se añade gota a gota n-BuLi (2,5 M, 7,4 mL, 18,4 mmoles) en hexanos. Después de 1 hora a -78 °C, se burbujea gas  $\text{CO}_2$  a través de la mezcla de reacción, y se mantiene el burbujeo durante 1 hora a -78 °C. Para cortar la reacción se añade una disolución de HCl (1N, 50 mL), y la materia en bruto se purifica mediante HPLC para proporcionar el Compuesto 4 (1 g) como un sólido de color marrón brillante.

Ejemplo 4. Preparación del Compuesto 5



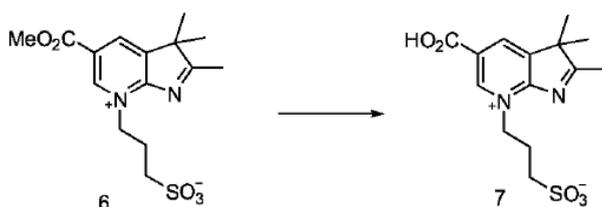
- 30 A una disolución del Compuesto 4 (0,5 g, 2,5 mmoles) en MeOH (10 mL), se añade  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (unas pocas gotas), y la mezcla se mantiene en reflujo durante 72 horas. Se añade NaOAc (1 g) y se agita durante 30 minutos. El concentrado y el residuo se disuelven en EtOAc (50 mL), se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL), agua salada (50 mL), y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El sólido marrón 5 (0,61 g) se usa en el siguiente etapa sin otra purificación.

## Ejemplo 5. Preparación del Compuesto 6



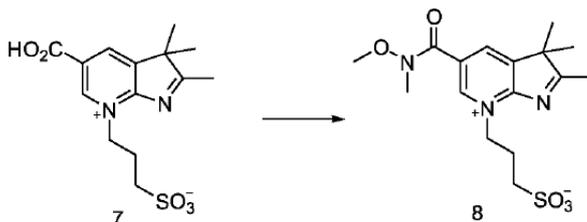
Una mezcla del Compuesto 5 (0,61 g, 2,8 mmoles) y 1,3-propanosulfona (2 g, 16,8 mmoles) en 1,2-diclorobenceno (6 mL) se calienta a 65 °C durante 3 horas. La mezcla se añade en éter (50 mL) y el precipitado se recoge mediante filtración, para proporcionar el compuesto 6 (0,8 g) como un sólido marrón. El Compuesto 6 sólido marrón se usa en el siguiente etapa sin otra purificación.

## Ejemplo 6. Preparación del Compuesto 7



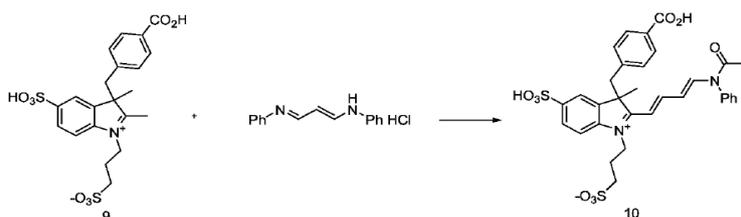
A una disolución del Compuesto 6 (0,8 g, 2,4 mmoles) en MeOH (15 mL) se añade gota a gota una disolución NaOH 1 N (5 mL) a temperatura ambiente. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se añade HCl 1 N (6 mL) para preparar un pH=2,0. La mezcla se purifica mediante HPLC para proporcionar el Compuesto 7 (0,52 g) como un sólido de color marrón claro.

## Ejemplo 7. Preparación del Compuesto 8



A 0° C, a una disolución del Compuesto 7 (1,21 g, 2,75 mmoles) en DMF (8 mL) y piridina (4 mL), se añade 1etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,633 g, 3,3 mmoles). Después de 15 minutos a 0 °C, se añade hidrocloreto de N,O-dimetilhidroxilamina (0,32 g, 3,3 mmoles). Después de 2 horas a temperatura ambiente, se añade dietil éter (50 mL) a la mezcla, y el precipitado se recoge mediante filtración. El material bruto se purifica mediante HPLC para proporcionar el Compuesto 8 (1,12 g) como un sólido de color marrón claro.

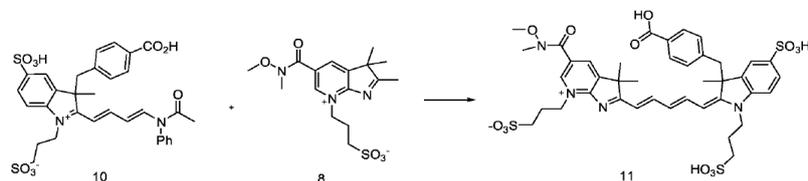
## Ejemplo 8. Preparación del Compuesto 10



A la disolución del Compuesto 9 (1,38 g, 2,32 mmol, Shaanxi Zhendi Chemical Biology Co., Ltd) en anhídrido acético (10 mL) y ácido acético (5 mL), se añade malonaldehído dianilida hidrocloreto (0,69 g, 2,66 mmoles). Después de 30

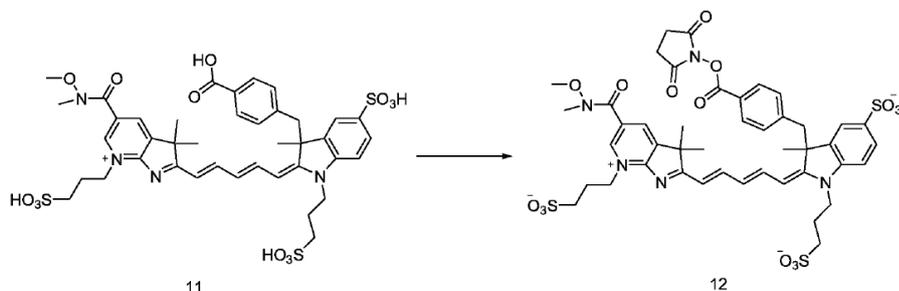
minutos a 115 °C, a la mezcla se añade EtOAc (50 mL) y el precipitado se recoge mediante filtración, y se lava mediante EtOAc (50 mL). El Compuesto 10, sólido rojo (1,51 g), se usa en la siguiente etapa sin purificación.

#### Ejemplo 9. Preparación del Compuesto 11



- 5 A la mezcla del Compuesto 10 (1,51 g, 2,32 mmoles) y el Compuesto 8 (1,12 g, 2,32 mmoles) en DMF (12 mL), se añade anhídrido acético (1,05 mL, 11,1 mmoles), seguido por trietilamina (2,58 mL, 18,6 mmoles). Después de 12 horas a temperatura ambiente, el Compuesto bruto 11 se precipita en dietil éter (200 mL), se filtra y se seca. El residuo se disuelve en H<sub>2</sub>O (50 mL), y se agita a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla se purifica mediante HPLC para proporcionar el Compuesto 11 (0,95 g) como un sólido rojo oscuro.

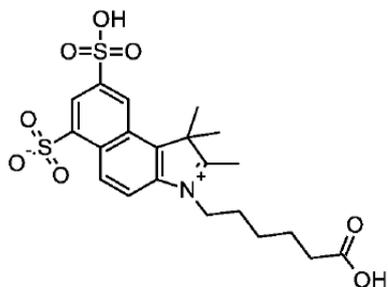
#### 10 Ejemplo 10. Preparación del Compuesto 12



- 15 A la disolución del Compuesto 11 (100 mg, 0,1 mmoles) en DMF (4 mL) se añade O-(N-succinimidilo)-N,N,N',N'-tetrafluoroborato de tetrametiluronio (35 mg, 0,12 mmoles), seguido de trietilamina (0,3 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La disolución se echa en EtOAc (15 mL). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (3 x 10 mL), éter (1 x 10 mL) y se seca bajo vacío para proporcionar el Compuesto 12 como un polvo de color azul brillante (110 mg).

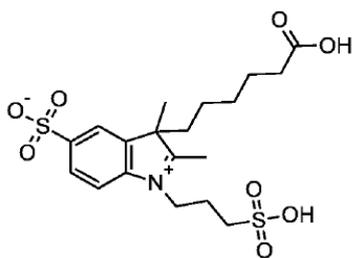
#### Ejemplo 11. Preparación del Compuesto 14

- 20 El indol 14 que se desea, se prepara a partir de la reacción de la sal potásica del ácido 1,1,2-trimetilbenzilindol-6,8-disulfónico (5,0 g, 0,011 moles) y ácido 6-bromohexanoico (5,3 g, 0,027 moles) en diclorobenceno a 120°C durante la noche, seguido del procedimiento de trabajo como se describe en BIOCONJUGATE CHEM., 105-111 (1993) y 356-362 (1996).



14

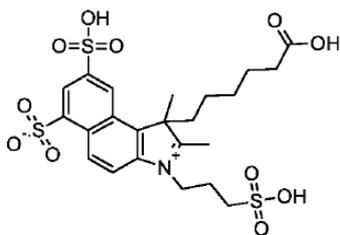
Ejemplo 12. Preparación del Compuesto 15



15

5 El Compuesto 15 se sintetiza análogamente a partir de la reacción de Fisher de 4-sulfofenilhidrazina con ácido 7-metil-8-oxo-nonanoico, seguido de la cuaternización con 1,3-propanosultona utilizando un procedimiento como el que se describe en la Patente de E.E.U.U. N° 7.465.810.

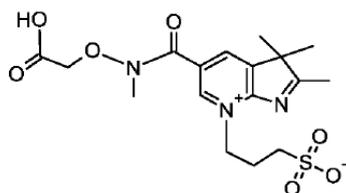
Ejemplo 13. Preparación del Compuesto 16



16

10 El Compuesto 16 se sintetiza análogamente a partir de la reacción de 6-hidrazinonaftaleno 1,3-disulfonato con ácido 7-metil-8-oxo-nonanoico, seguido de la cuaternización con 1,3-propanosultona utilizando un procedimiento como el que se describe en la Patente de E.E.U.U. 7.465.810.

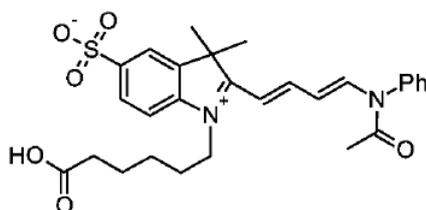
Ejemplo 14. Preparación del Compuesto 17



17

15 El Compuesto 17 se sintetiza análogamente a partir de la reacción del Compuesto 6 con O-carboximetilhidroxilamina según el procedimiento del Compuesto 8.

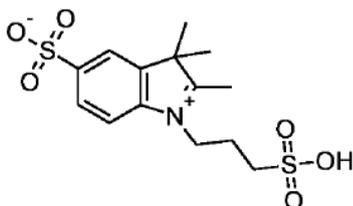
Ejemplo 15. Preparación del Compuesto 18



18

La imina 18 que se desea, se prepara a partir de la reacción del Compuesto 13 con hidrocloreuro de malonaldehído dianilida según el procedimiento del Compuesto 10.

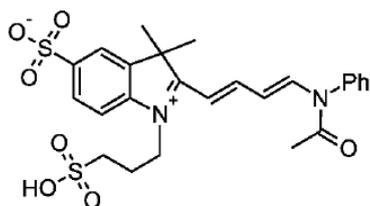
5 Ejemplo 16. Preparación del Compuesto 19.



19

El indol 19 que se desea, se prepara a partir de la reacción de la sal potásica del ácido 1,2,2-trimetilindol-5-sulfónico y 1,3-propanosultona, como se describe en BIOCONJUGATE CHEM., 105-111 (1993) y 356-362 (1996).

Ejemplo 17. Preparación del Compuesto 20

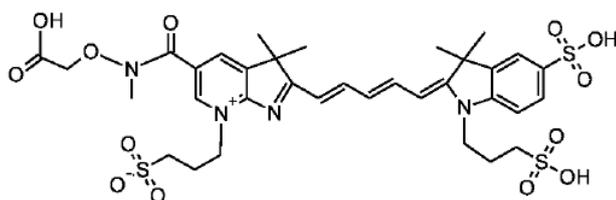


20

10

La Imina 20 que se desea, se prepara análogamente a partir de la reacción del Compuesto 19 con malonaldehído dianilida hidrocloreuro según el procedimiento del Compuesto 10.

Ejemplo 18. Preparación del Compuesto 21

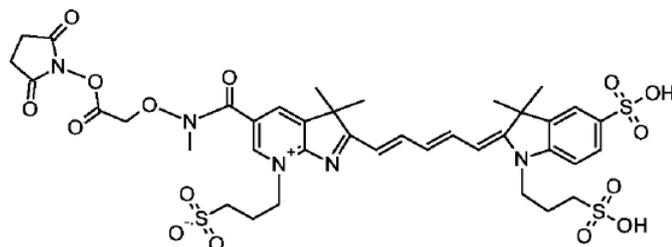


21

15 La Cianina 21 se prepara análogamente a partir de la condensación del Compuesto 20 con el Compuesto 17 según

el procedimiento del Compuesto 11.

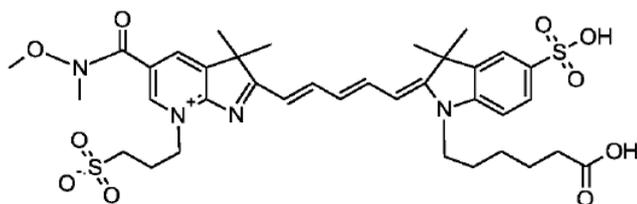
Ejemplo 19. Preparación del Compuesto 22



22

5 La Cianina 22 se prepara a partir del Compuesto 21 según el procedimiento del Compuesto 12.

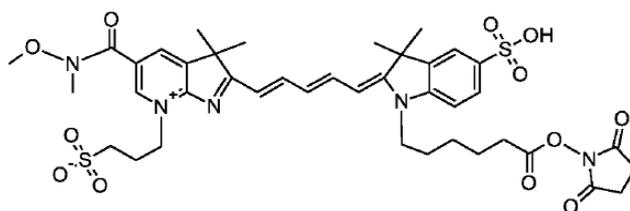
Ejemplo 20. Preparación del Compuesto 23



23

La Cianina 23 se prepara análogamente a partir de la condensación del Compuesto 18 con el Compuesto 8 según el procedimiento del Compuesto 11.

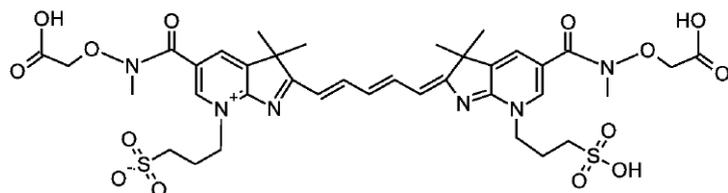
10 Ejemplo 21. Preparación del Compuesto 24



24

La Cianina 24 se prepara análogamente a partir del Compuesto 23 según el procedimiento del Compuesto 12.

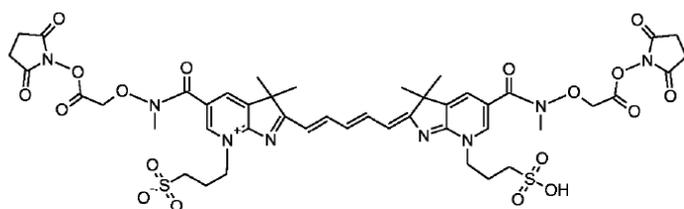
## Ejemplo 22. Preparación del Compuesto 25



25

5 Una disolución del Compuesto 17 (100 mg, 0,25 mmoles) y malonaldehído bis(fenilamina) monohidrocloruro (27 mg, 0,1 mmoles) en ácido acético (0,5 mL) y anhídrido acético (0,5 mL), se calienta a 120°C durante 1 hora, seguido de la adición de NaOAc (50 mg). La finalización de la reacción se monitorea mediante absorción del espectro en etanol. La mezcla de reacción se calienta hasta que el intermedio desaparece (monitoreado mediante el espectro de absorción). La mezcla de reacción se enfría y se echa en acetato de etilo (50 mL). El producto bruto se recoge mediante centrifugación y se lava dos veces con acetato de etilo. La purificación con HPLC preparativa proporciona el Compuesto 25 como un polvo azul brillante (90 mg).

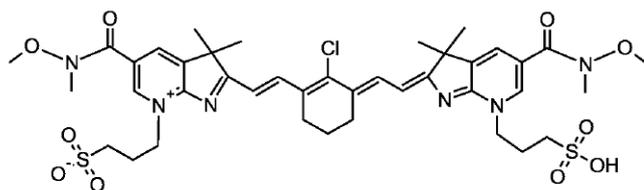
## 10 Ejemplo 23. Preparación del Compuesto 26



26

La Cianina 26 se prepara análogamente a partir del Compuesto 25 según el procedimiento del Compuesto 12.

## Ejemplo 24. Preparación del Compuesto 27

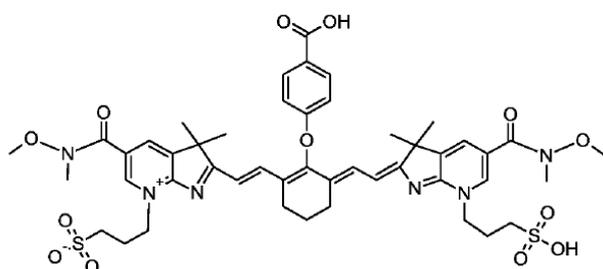


27

15 Una disolución del Compuesto 8 (370 mg, 1 mmol), y 2-cloro-formil-3-(hidroximetil)ciclohex-1-eno (70 mg, 0,4 mmoles) en 1-butanol (48 mL) y benceno (12 mL), se calienta a reflujo durante 2 horas. A la mezcla de reacción se añade 1-butanol (7 mL) y benceno (3 mL). La mezcla se continúa a reflujo durante 10 horas con eliminación de agua mediante un condensador Dean-Stark. Después de la eliminación del disolvente, el residuo se purifica mediante HPLC preparativa para proporcionar el Compuesto 27.

20

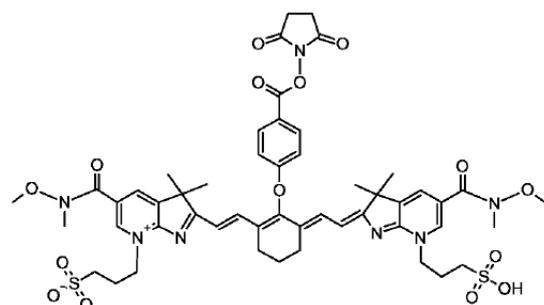
## Ejemplo 25. Preparación del Compuesto 28



28

5 El Compuesto 27 (90 mg) se transforma en el Compuesto 28 mediante ácido 4-hidroxibenzoico e hidruro de sodio en DMF según el procedimiento de N. Narayanan y G. Patonary (J. ORG. CHEM., 60, 2391(1995)). La purificación por HPLC preparativa proporciona el Compuesto 28 puro (80 mg).

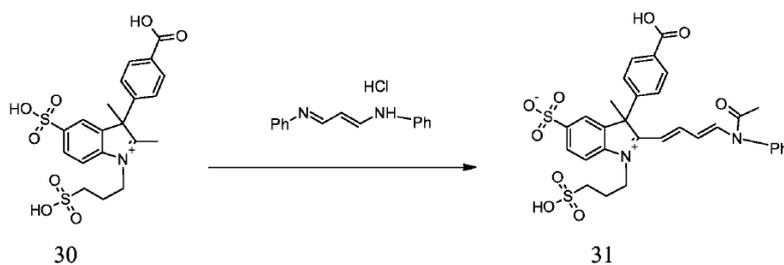
## Ejemplo 26. Preparación del Compuesto 29



29

La Cianina 29 se prepara análogamente a partir del Compuesto 28 según el procedimiento del Compuesto 12.

## 10 Ejemplo 27. Preparación del Compuesto 31

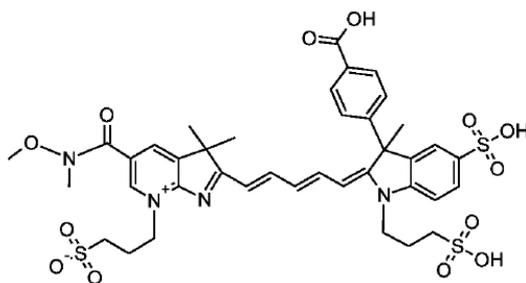


30

31

La Imina 31 se prepara análogamente a partir del Compuesto 30 (Shaanxi Zhendi Chemical Biology Co., Ltd) según el procedimiento del Compuesto 10.

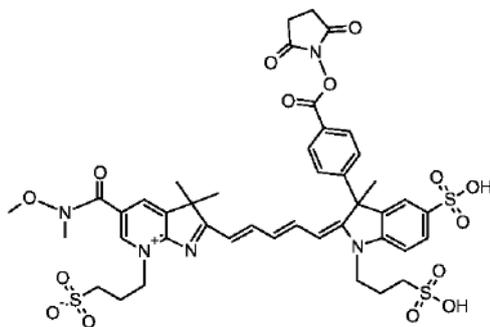
Ejemplo 28. Preparación del Compuesto 32



32

5 La Cianina 32 se prepara análogamente mediante la reacción del Compuesto 31 (Shaanxi Zhendi Chemical Biology Co., Ltd) con el Compuesto 8 según el procedimiento del Compuesto 11.

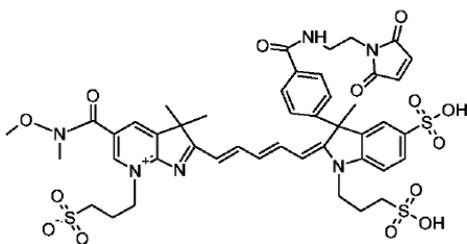
Ejemplo 29. Preparación del Compuesto 33



33

La Cianina 32 se transforma análogamente a su éster activo 33 según el procedimiento del Compuesto 12.

Ejemplo 30. Preparación del Compuesto 34



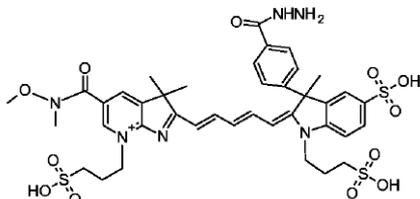
34

10

Al Compuesto 33 (10 mg) en DMF (0,2 mL) se añade a temperatura ambiente 4 equivalentes de trietilamina y 1,2 equivalentes de N-(2-aminoetil)maleimida, sal del ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 60 minutos. La disolución DMF se echa en éter, y la suspensión resultante se centrifuga para recoger el sólido, que se seca al aire. El producto bruto se purifica además con cromatografía en silica gel para producir el Compuesto 34 deseado.

15

## Ejemplo 31. Preparación del Compuesto 35



## 35

- 5 Al Compuesto 33 (50 mg) en DMF (0,2 mL), se añade hidrazina (100 mg en 1 mL de agua) a temperatura ambiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 60 minutos. La disolución DMF se echa en agua, y la suspensión resultante se centrifuga para recoger el sólido, que se seca al aire. El producto bruto se purifica además mediante HPLC para producir el Compuesto 35 deseado.

## Ejemplo 32. Preparación de Conjugados Proteína-Tinte

- 10 Los conjugados de proteína-tinte se pueden preparar mediante cualquier método adecuado, tal como aquellos descritos en, por ejemplo, Haugland et al. 1995, Meth. Mol. Biol. 45:205; Haugland, 1995, Meth. Mol. Biol. 45:223; Haugland, 1995, Meth. Mol. Biol. 45:235; Haugland, 2000, Current Protocols in Cell Biology 16.5.1-16.5.22. Por ejemplo, pueden prepararse conjugados de proteína-tinte usando un éster de succinimidilo de la invención, como sigue.

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

- 25 Para muchas aplicaciones, tales como para producir anticuerpos marcados con tinte, se usa un cociente molar de 10 a 50 equivalentes de tinte por 1 equivalente de proteína. Se entenderá que las condiciones de reacción y las concentraciones de reactivo óptimas, se pueden determinar empíricamente. La optimización de la conjugación de tinte-proteína es bien conocida en la técnica, y se describe, por ejemplo, en las referencias citadas en la presente memoria.

## Ejemplo 33. Preparación de Conjugados Anticuerpo-Tinte

- 30 Conjugados de tinte de anticuerpo de IgG. Se prepararon conjugados de tinte de los Compuestos 12, 22, 26, 29, 40, 48, 49 y 50 usando el siguiente protocolo general, con variaciones mínimas, como se indica a continuación.

*Etapas 1. Preparación de la disolución de proteína:* Se mezclan 50  $\mu$ L de  $\text{NaHCO}_3$  1 M con 450  $\mu$ L de una disolución de proteína IgG (4 mg/mL) para obtener una disolución de la muestra de proteína de 0,5 mL (Disolución A). La disolución resultante debería tener un pH de  $8,5 \pm 0,5$ .

- 35 *Etapas 2. Preparar la disolución de tinte:* A 50  $\mu$ L de DMSO se añade 1 mg del compuesto de tinte, y se agita hasta que el compuesto se haya disuelto completamente para obtener una disolución de tinte (Disolución B).

*Etapas 3: Llevar a cabo la reacción de conjugación:* Añadir la disolución de proteína (A) a la disolución de tinte (B) con agitación eficaz, y mantener la mezcla de reacción en agitación durante 1-3 horas para obtener el conjugado de proteína-tinte.

- 40 *Etapas 4: Purificar el conjugado:*

a) Cargar una columna PD-10 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) con la mezcla de reacción del conjugado de proteína-tinte (a partir de la etapa 3, filtrar si es necesario) o de sobrenadante, tan pronto como el líquido corra en la columna pre-empaquetada justo por debajo de la punta de la superficie;

- 45 b) Añadir 1 mL de tampón de elución 1X PBS tan pronto como la muestra corra justo por debajo de la punta de la superficie de la resina; Repetir este proceso de 'lavado de la muestra' dos veces; Añadir 1X de la

disolución tampón de elución para eluir la muestra deseada;

- c) Recoger la banda que corre más rápido, que es usualmente la proteína marcada deseada. Mantener la banda que corre más despacio, que es usualmente el tinte hidrolizado o libre, hasta que se identifique el producto deseado.

5 *Etapa 5. Caracterización del conjugado tinte-proteína deseado:*

- a) Medir el OD (absorbancia) a una longitud de onda de absorción máxima de la proteína, que es 280 nm, y a la longitud de onda de absorción máxima del tinte. Para muchos de los espectrofotómetros, se necesita que las muestras (de las fracciones de columna) se diluyan con agua des-ionizada para que los valores OD estén en el intervalo de 0,1 a 0,9. La longitud de onda de absorción máxima de la amida del Compuesto 12 es aproximadamente a 683 nm. Para usar con otros compuestos de tinte, la longitud de onda de absorción máxima del tinte debería medirse antes de las conjugaciones.

- b) Calcular el grado de sustitución (GDS) utilizando la siguiente ecuación para el Compuesto 12:

$$\text{GDS} = \frac{[\text{tinte}]}{[\text{proteína}]} = \frac{A_{683} \times \epsilon_p}{250000(A_{280} - 0,035A_{683})}$$

donde [tinte] es la concentración de tinte y [proteína] es la concentración de proteína. La concentración de tinte se puede calcular fácilmente a partir de la Ley de Beer-Lambert:  $A = \epsilon_{\text{tinte}} C \times L$ , en donde A es la absorbancia,  $\epsilon_{\text{tinte}}$  es el coeficiente de extinción molar, C es la concentración, y L es la longitud del recorrido de luz que atraviesa la disolución. La concentración de proteína se puede estimar bien mediante el peso (añadido a la reacción), si la eficacia de conjugación es lo suficientemente alta (preferiblemente >70%), o, más exactamente, calcularse mediante la Ley de Beer-Lambert:  $A = \epsilon_{\text{proteína}} C \times L$ . Por ejemplo, IgG tiene un valor  $\epsilon$  de  $203.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Debe señalarse que para obtener GDS exactos, el conjugado debe estar libre del tinte no conjugado.

Para un marcaje efectivo, el grado de sustitución debería estar entre 3-20 moles del Compuesto 12 para un mol de anticuerpo para la mayoría de los anticuerpos. El GDS que proporciona el marcaje óptimo dependerá del anticuerpo, y en algunos casos, un GDS mayor puede proporcionar un marcaje mejorado. El marcaje óptimo se determina empíricamente mediante la preparación de conjugados de tinte en un intervalo de GDS y comparando las intensidades de fluorescencia medidas. Se muestran ejemplos en las figuras.

Ejemplo 34. Preparación de Conjugados de Tinte de Glicoproteínas oxidadas con Peryodato

Se tratan muestras de 5 mg de anticuerpo de IgG de cabra (que tiene una cadena polisacárida fijada a la proteína) en 1 mL de acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,135 M, pH 5,5, con 2,1 mg de metaperyodato de sodio en hielo durante un período de tiempo determinado experimentalmente como suficiente para dar como resultado la cantidad deseada de grupos aldehído en la glicoproteína, que se hacen reaccionar entonces con el Compuesto 35. Las reacciones se detienen mediante la adición de 30  $\mu\text{L}$  de etilenglicol. Los anticuerpos se purifican en una columna Sephadex G25 empaquetadas en PBS a pH 7,2. Se añade 1/10 volúmenes de bicarbonato de sodio 1 M para elevar el pH y se añade el Compuesto 35 a un cociente molar de tinte a proteína de 50:1. La reacción se agita a temperatura ambiente durante un período de tiempo determinado experimentalmente como suficiente para dar como resultado el cociente de tinte/proteína deseado. Se añade cianoborohidruro de sodio hasta una concentración final de 10 mM y, la reacción se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. Se purifican los conjugados de anticuerpo mediante diálisis y en columnas Sephadex G25 como se describe en la presente memoria. Las glicoproteínas oxidadas con peryodato en geles y transferencias pueden marcarse también, mediante la adaptación de los métodos como se describen en Estep y Miller, 1986, Anal. Biochem. 157:100-105.

Ejemplo 35. Preparación de un Conjugado de Tinte-Proteína usando un Tinte Reactivo con Tiol

Se prepara una disolución de beta-galactosidasa, una proteína rica en grupos tiol libres, en PBS (2,0 mg en 400  $\mu\text{L}$ ). La disolución de proteína se trata entonces con una disolución 10 mg/mL del derivado de maleimida del Compuesto 34 en DMF. El tinte que no reaccionado se retira de la columna de centrifugación. El grado de sustitución por el tinte se estima usando el cociente de extinción del tinte libre, como se describe en el Ejemplo 33. La concentración de proteína se estima a partir de la absorbancia a 280 nm, corregida por la absorbancia del Compuesto 34 a esa longitud de onda.

Ejemplo 36. Preparación de Conjugados de Aminodextrano-Tinte

Se preparan conjugados de aminodextrano-tinte como sigue, usando aminodextrano de PM 70.000 (50 mg) derivatizados con una media de 13 grupos amino como ejemplo. Se disuelve el aminodextrano (50 mg) a 10 mg/mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M. Se añaden los Compuestos 12, 22, 26, 29, 40, 48, 49 ó 50 para proporcionar un cociente tinte/dextrano de aproximadamente 10-15. Después de 6-12 horas, el conjugado resultante se purifica en SEPHADEX G-50 y se eluye con agua. En algunos casos, se conjugan 6-10 moles de tinte para dextrano de PM 70.000.

## Ejemplo 37. Preparación de Microesferas marcadas con Tinte

Las microesferas se pueden marcar con un tinte de la invención usando cualquier protocolo adecuado. Las microesferas modificadas químicamente para tener grupos funcionales tales como amino, carboxilo, o aldehídos en la superficie, se pueden marcar en superficie conjugando covalentemente los grupos de superficie con los correspondientes tintes reactivos, como se enumeran en la Tabla 1. Por ejemplo, las microesferas modificadas con amina se conjugan fácilmente con los tintes de la invención a través de ésteres de succinimidilo, tales como los Compuestos 12, 22, 26, 29, 40, 48, 49 ó 50.

Una proteína marcada con tinte, preparada como se describe anteriormente, puede acoplarse covalentemente a través de sus residuos amino con grupos carboxilato en una microesfera usando 3-(dimetilaminopropil)carbodiimida de etilo (EDAC). Alternativamente, la proteína marcada con tinte puede adsorberse pasivamente sobre las microesferas. Por ejemplo, se suspenden microesferas modificadas con carboxilato en una disolución de proteína marcada con tinte, se deja adsorber pasivamente la proteína sobre las microesferas y, se retira la proteína en exceso por centrifugación y lavado. Las micropartículas de un tamaño que no pueda centrifugarse, se separan de la proteína en exceso mediante diálisis a través de una membrana semi-permeable con un corte de alto PM o por cromatografía de filtración en gel. Las microesferas biotiniladas se pueden tratar con una estreptavidina, avidina o anti-biotina conjugada con un tinte de la invención, como se describe anteriormente.

## Ejemplo 38. Preparación de Conjugados de Nucleótido-tinte

Los nucleótidos conjugados con los tintes de la invención se pueden preparar fácilmente empleando cualquier procedimiento adecuado, tales como los que se describen en M. Nimmakayalu et al., 2000, *Biotechniques* 28, 518-522; Muhlegger et al., 1990, *Biol Chem Hoppe Seyler* 371, 953-965; y Giaid et al, 1989, *Histochemistry* 93, 191-196.

Se describen a continuación ejemplos de conjugaciones particulares.

A 2 mg de 5'-trifosfato de 5(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina (Sigma-Aldrich) en 100  $\mu$ L de agua se añaden los Compuestos 12, 22, 26, 29, 40, 48, 49 ó 50 en 100  $\mu$ L de DMF y 5  $\mu$ L de trietilamina. Después de 3 horas, se evapora la disolución y el residuo se purifica mediante HPLC. Las fracciones de producto se liofilizan para proporcionar el conjugado nucleotídico fluorescente.

Alternativamente, se preparan conjugados de tinte fluorescente de 5'-trifosfato de desoxiuridina a partir de 5'-trifosfato de 5-(3-amino-1-propinil)-2'-desoxiuridina, o tratando un nucleótido tiolado o un nucleótido tiofosfatado con un tinte reactivo con tiol de la invención (tal como el Compuesto 34 de maleimida).

Alternativamente, se hace reaccionar 5'-trifosfato de 2'-(o 3')-2-aminoetilaminocarboniladenosina con un ligero exceso de los Compuestos 12, 22, 26, 29, 40, 48, 49 ó 50, seguido de la precipitación con etanol, y se purifica el producto modificado con ribosa por HPLC preparativa.

## Ejemplo 39. Preparación de Conjugados de Oligonucleótido-Tinte

Se disuelve una secuencia del cebador M13 de 18 bases modificado en 5'-amina (aproximadamente 100  $\mu$ g) en 4  $\mu$ L de agua. A esto se añade 250  $\mu$ g del Compuesto 12, 22, 26, 29, 40, 48, 49 ó 50 en 100  $\mu$ L de borato de sodio 0,1 M, pH 8,5. Después de 16 horas, se añaden 10  $\mu$ L de NaCl y 3 volúmenes de etanol frío. La mezcla se enfría a -20 °C, se centrifuga, y se decanta sobrenadante, el sedimento se aclara con etanol y se disuelve entonces en 100  $\mu$ L de agua. El oligonucleótido marcado se purifica por HPLC. Se recoge el pico deseado y se evapora para proporcionar el conjugado de oligonucleótido-tinte fluorescente.

## Ejemplo 40. Análisis Celular por Citometría de Flujo usando Conjugados de Tinte-Anticuerpo

Los anticuerpos específicos de analito conjugados con un compuesto de tinte de la presente invención (es decir, anticuerpos marcados) son útiles para el análisis de células sanguíneas (por ejemplo, en muestras de sangre completa) mediante citometría de flujo. Los anticuerpos marcados se pueden utilizar para marcar (teñir) proteínas celulares, y se detectan las células marcadas utilizando un citómetro de flujo.

Las muestras (100  $\mu$ L) de sangre completa (preferiblemente recogidas en EDTA) se tiñen con un conjugado de tinte-anticuerpo durante 30-60 minutos en la oscuridad y una concentración de conjugado de tinte de 1  $\mu$ g o menos por 0,1 mL de sangre. Después de la tinción, se añaden a la muestra 2 mL de una Disolución de Lisis 1X FACS™ (BD Bioscience, San José, CA), la muestra se mezcla a velocidad media en un agitador vórtex y después se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. La muestra se centrifuga a 200-500 g (preferiblemente 200-300 g) durante 5 minutos y se decanta el sobrenadante. La muestra se lava (se resuspende en 2 mL de tampón de lavado de BSA al 0,5% /PBS, se mezcla y se centrifuga) dos veces, en bien 0,5 mL de tampón de lavado o en 150  $\mu$ L de Tampón de Estabilización de la Fijación, y se mantiene a 4°C hasta el análisis citométrico de flujo.

El análisis de las células teñidas se lleva a cabo empleando un citómetro de flujo BD Canto II (BD Biosciences, San José, CA) equipado con un láser rojo (~640 nm). Los biopolímeros fluorescentes que incorporan los compuestos de tinte, tales como los Compuestos 12 y 48 a APC, muestran un máximo de excitación que coincide estrechamente

con la emisión de 640 nm del láser rojo, y la emisión de los biopolímeros se miden en el canal de detección de 710/20 nm. El citómetro de flujo se ajusta siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis citométrico de flujo de la muestra de células teñidas, se lleva a cabo según los protocolos del fabricante, y los datos se analizan utilizando técnicas estándar bien conocidas en el campo, para obtener la intensidad de fluorescencia media para la población celular de interés.

Se entenderá que el conjugado de anticuerpo particular usado, y los componentes específicos de la reacción y, las condiciones particulares de la reacción que se emplean, pueden tener un efecto en los resultados obtenidos. Se puede llevar a cabo una experimentación rutinaria, para determinar los componentes de reacción preferidos, tales como los tampones o las disoluciones de lisis, y las condiciones de reacción, incluyendo los tiempos y temperaturas de tinción. Tal rutina de optimización de las condiciones de ensayo, es una práctica estándar en el campo de los ensayos basados en inmunotinción.

#### Ejemplo 41. Conjugados de Tinte de Anticuerpos Anti-CD8, CD19 y CD20

Se prepararon conjugados de tinte utilizando anticuerpos específicos para CD8 y CD20 (BD Biosciences, San José, CA), conjugado cada uno, en preparaciones separadas, para los Compuestos 12 y 48 y en un intervalo de cocientes de tinte a proteína. La tinción de células se preparó esencialmente como se describe anteriormente en el ejemplo 40. Los conjugados de anticuerpo de los anticuerpos CD8, CD19 y CD20 se usaron para analizar los linfocitos en muestras de sangre completa, como se describe esencialmente en el ejemplo 40 anterior.

Los datos indicaban un cociente de tinte para proteína para cada par de anticuerpo-tinte. Para cada anticuerpo, el cociente de tinte a proteína óptimo para cada uno de los tres tintes aparecía a cocientes similares. Comparando los diferentes anticuerpos conjugados con los mismos tintes, los cocientes de tinte a proteína óptimos eran significativamente diferentes. Comparando la fluorescencia máxima de tinción obtenida usando cada compuesto de tinte, los Compuestos 12 y 48 produjeron mejor tinción fluorescente que la de espectros Alexa Fluor® 700 similares, como se observa en la Figura 8 (CD8).

Figura 8. Se observó que los conjugados de tinte-anticuerpo CD8 marcado de los Compuestos 12 y 48 proporcionan el marcaje adecuado de poblaciones de linfocitos para usar en los ensayos citométricos de flujo inmunofluorescente, el cual es superior para los marcajes que resultaron de los espectros equivalentes a Alexa Fluor® 700. Los resultados indican que todos los conjugados de tinte de la invención son útiles para la preparación de reactivos de detección específicos de antígeno para ensayos de inmunofluorescencia analizados mediante citometría de flujo. En general, se determina empíricamente el cociente de tinte a proteína óptimo para cada anticuerpo para marcar.

Figura 9. Se observa que el conjugado de anticuerpo-tinte del CD20 marcado con el Compuesto 12, proporciona el marcaje adecuado de las poblaciones de linfocitos para usar en los ensayos citométricos de flujo de inmunofluorescencia, el cual es superior para el marcaje resultante de los espectros equivalentes para APC-H7.

#### Ejemplo 42. Conjugados en tándem de tinte de Anticuerpos de anti-CD8 y anti-CD19

Se prepararon conjugados en tándem de tinte con APC utilizando anticuerpos específicos para CD 8 (clones SK1 de BD Biosciences, San José, CA), para el Compuesto 12 como se describe esencialmente en la bibliografía (Patente de E.E.U.U 5.055.556 de Stryer et al.; y Clin. Chem 2004, 50: 1921-1929). El conjugado de anticuerpo del anticuerpo CD8 se utilizó para analizar los linfocitos en muestras de sangre completa, como se describe esencialmente en el ejemplo 40 anterior. Comparando la fluorescencia máxima de tinción obtenida usando cada compuesto de tinte, el conjugado en tándem del Compuesto 12-APC produjo la mejor tinción fluorescente que la de espectros Alexa Fluor® 700 similares, como se observa en las Figura 10 (CD8) y 11 (CD19).

Se observó que el conjugado en tándem de tinte de anticuerpo del Compuesto 12-APC CD8 proporciona el marcaje adecuado de poblaciones de linfocitos para usar en los ensayos citométricos de flujo inmunofluorescentes, el cual es superior a los marcajes resultantes de los espectros equivalentes a Alexa Fluor® 700-APC y APC-Cy5.5 (véase la Figura 10).

Se observa que el conjugado de tinte-anticuerpo del CD19 marcado con el Compuesto 12 en tándem, proporciona el marcaje adecuado para las poblaciones de linfocitos para usar en los ensayos citométricos de flujo inmunofluorescentes, el cual es superior al resultante del anticuerpo CD19 marcado Alexa Fluor® 700 (véase la Figura 11).

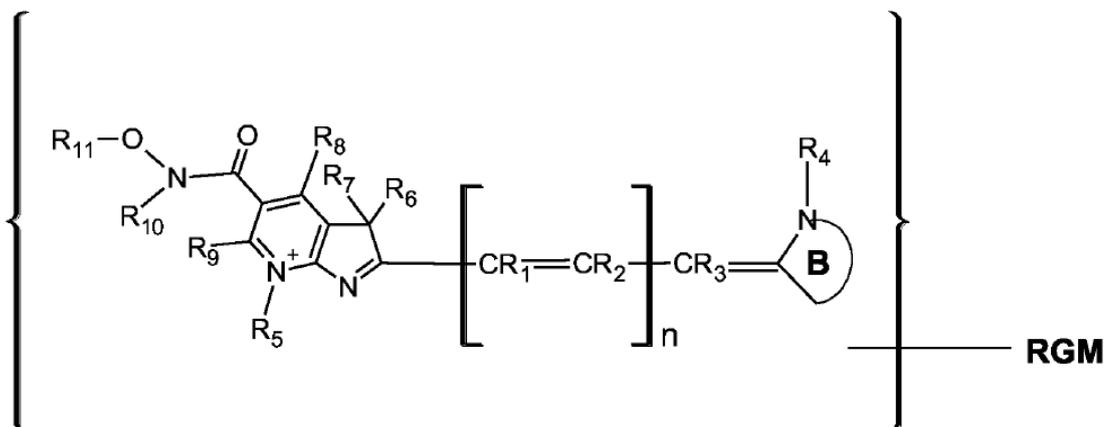
#### Ejemplo 43. Ensayo de Fotoestabilidad

Se realizaron experimentos de fotoblanqueo de los Compuestos 12, 48 y 55 a concentraciones 1  $\mu$ M, y comercialmente disponibles en Alexa Fluor 700. Los compuestos se irradiaron con una lámpara de Mercurio A100 W en PBS (pH 7,0), donde todos los tintes recibieron la misma cantidad de irradiación como se determinó mediante medidas fotométricas. Como se muestra en la FIG. 3, los Compuestos 12, 48 y 55 de la invención muestran una fotoestabilidad mucho mayor (tasa de fotoblanqueo mucho más lenta) que la de Alexa Fluor 700. Se ensayó también la fotoestabilidad de sus tándems APC (preparados como se describe en la Patente de E.E.U.U. N° 5.055.556 de Stryer et al.; y Clin Chem 2004, 50: 1921-1929). Como se muestra en la FIG. 4, el tándem APC de los Compuestos

12, 48, 50, 53 y 54 de la invención, muestran una fotoestabilidad mucho mayor (tasa de fotoblanqueo mucho más lenta) que la del espectro similar de Alexa Fluor 700.

Sin perjuicio para las reivindicaciones adjuntas, la divulgación establecida en la presente memoria, también se define mediante las siguientes cláusulas:

- 5 1. Un compuesto de tinte de cianina-azaindolina sustituido con un 5-hidroxiato, que comprende un grupo 5-hidroxiato-azaindolina unido a un anillo heterocíclico de 5 miembros a través de un grupo de unión de polimetino divalente, en donde uno o más grupos de 5-hidroxiato-azaindolina, del grupo de unión de polimetino divalente y del anillo heterocíclico de 5 miembros, se sustituye con un resto de un grupo reactivo (RGM).
- 10 2. El compuesto según la Cláusula 1, en donde el compuesto tiene una absorbancia máxima que es 600 nm o superior.
3. El compuesto según la Cláusula 1, en donde el compuesto tiene una emisión máxima que es 700 nm o superior.
4. El compuesto según la Cláusula 1, en donde el compuesto es fotoestable.
- 15 5. El compuesto según la Cláusula 1, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula I:



Fórmula I

en donde:

20 el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno y comprende además de cero a tres anillos aromáticos fusionados; en donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo) y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos fusionados se sustituyen opcionalmente con uno o más sustituyentes que se  
 25 seleccionan del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, y un L-RGM;

n es de 0 a 3;

30 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

35 R<sub>6</sub>-R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>-R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un

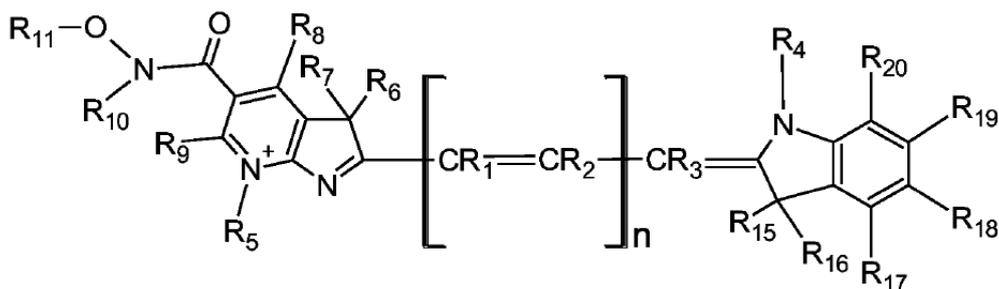
fosfonilo o un L-RGM;

R<sub>10</sub>-R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

RGM es un grupo reactivo químicamente; y

5 L es un enlazador.

6. El compuesto según la Cláusula 5, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula II:



Fórmula II

en donde:

10 n es de 0 a 3;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

15 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

20 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;

R<sub>10</sub>-R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

25 RGM es un grupo reactivo químicamente; y

L es un enlazador; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>20</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

7. El compuesto según la Cláusula 6, en donde:

30 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un alquilamino, un arilamino, un tioalquilo, un tiolarilo, un ariloxilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

35 R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un halógeno, sulfonato, o un L-RGM;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM.

8. El compuesto según la Cláusula 6, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

5 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, sulfonato, o un L-RGM; y

10 R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-RGM.

9. El compuesto según la Cláusula 6, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

15 R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> y R<sub>20</sub> son un hidrógeno cada uno;

R<sub>18</sub> es sulfonato; y

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-RGM.

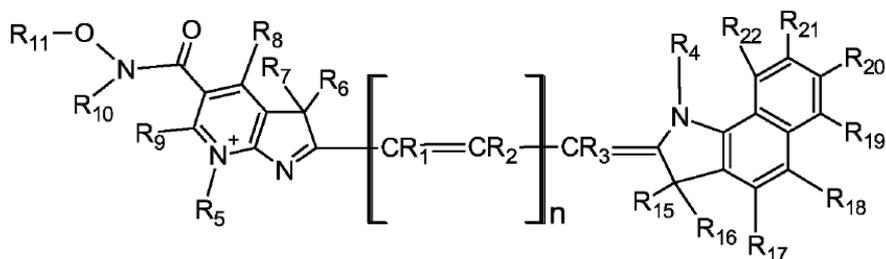
20 10. El compuesto según la Cláusula 6, en donde L es nulo, es un alquilo, un alcoxilo, un tialquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo.

11. El compuesto según la Cláusula 6, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

25 12. El compuesto según la Cláusula 6, en donde RGM es una acrilamida, una amina, un ácido carboxílico, un éster de ácido carboxílico activado, una acilazida, un acilnitrilo, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, un haluro de arilo, una azida, una aziridina, un boronato, un diazoalcano, una halogenoacetamida, una halotriazina, una hidrazina, una hidroxilamina, un éster imido, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un complejo de platino reactivo, un haluro sulfonilo o un derivado de psoraleno.

13. El compuesto según la Cláusula 6, en donde RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.

14. El compuesto según la Cláusula 5, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula III:



30

Fórmula III

en donde:

n es de 0 a 3;

35 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

5 R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

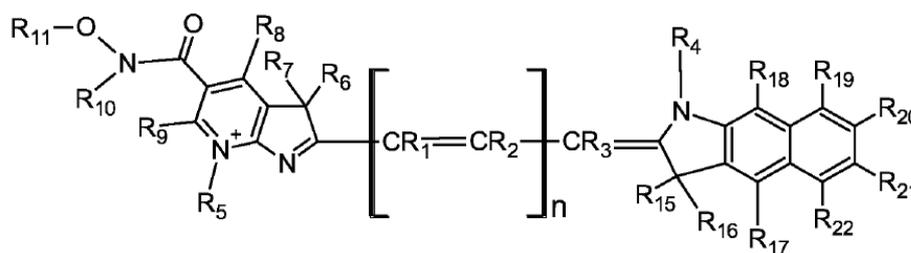
R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

10 RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

opcionalmente uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

15. El compuesto según la Cláusula 5, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula IV:



15

Fórmula IV

en donde:

n es de 0 a 3;

20 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, un fosfonilalquilo, o un L-RGM;

25 R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

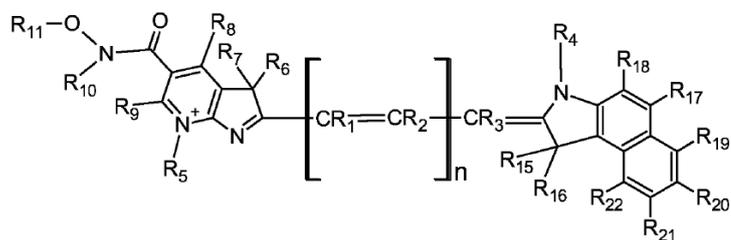
30 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

35 opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

16. El compuesto según la Cláusula 5, en donde el compuesto se describe mediante la fórmula V:



Fórmula V

en donde:

5 n es de 0 a 3;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, un fosfonilalquilo, o L-RGM;

20 RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

17. El compuesto según la Cláusula 16, en donde:

25 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

30 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un sulfonato, o un L-RGM; y

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, un carboxialquilo, o un L-RGM.

18. El compuesto según la Cláusula 16, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

35 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno o un sulfonato; y

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-RGM.

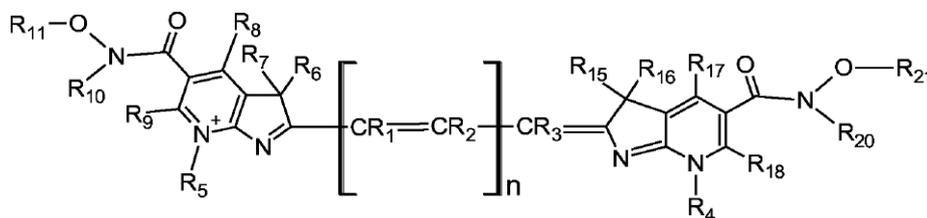
19. El compuesto según la Cláusula 16, en donde L es nulo, es un alquilo, un polietilenglicol, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, una poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo.

20. El compuesto según la Cláusula 16, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

21. El compuesto según la Cláusula 16, en donde RGM es acrilamida, una amina, un ácido carboxílico, un éster de ácido carboxílico activado, una acilazida, un acilnitrilo, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, un haluro de arilo, una azida, una aziridina, un boronato, un diazoalcano, una halogenoacetamida, una halotriazina, una hidrazina, una hidroxilamina, un éster imido, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un complejo de platino reactivo, un haluro sulfonilo o un derivado de psoraleno.

22. El compuesto según la Cláusula 16, en donde RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.

23. El compuesto según la Cláusula 5, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula VI:



Fórmula VI

en donde:

n es de 0 a 3;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;

R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>20</sub> y R<sub>21</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

24. El compuesto según la Cláusula 23, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un cada uno independientemente un hidrógeno, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un sulfonato, un fosfonilo o un L-RGM; y

5 R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM.

25. El compuesto según la Cláusula 23, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, o un sulfonato; y

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-RGM.

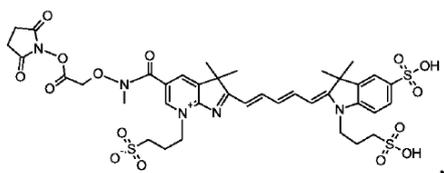
15 26. El compuesto según la Cláusula 23, en donde L es nulo, es un alquilo, un polietilenglicol, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, una poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo.

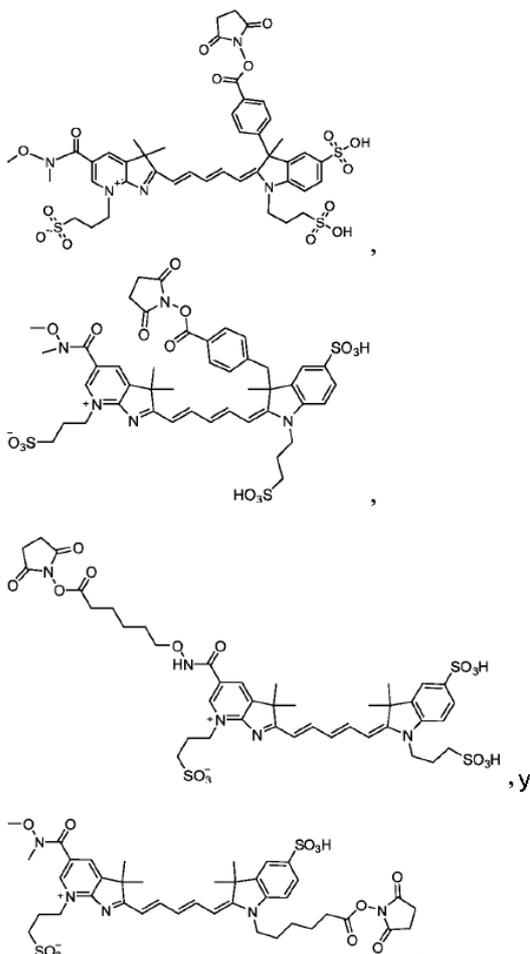
27. El compuesto según la Cláusula 23, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

20 28. El compuesto según la Cláusula 23, en donde RGM es una acrilamida, una amina, un ácido carboxílico, un éster de ácido carboxílico activado, una acilazida, un acilnitrilo, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, un haluro de arilo, una azida, una aziridina, un boronato, un diazoalcano, una halogenoacetamida, una halotriazina, una hidrazina, una hidroxilamina, un éster imido, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un complejo de platino reactivo, un haluro sulfonilo o un derivado de psoraleno.

29. El compuesto según la Cláusula 23, en donde RGM es un éster de succinimidilo, o una maleimida.

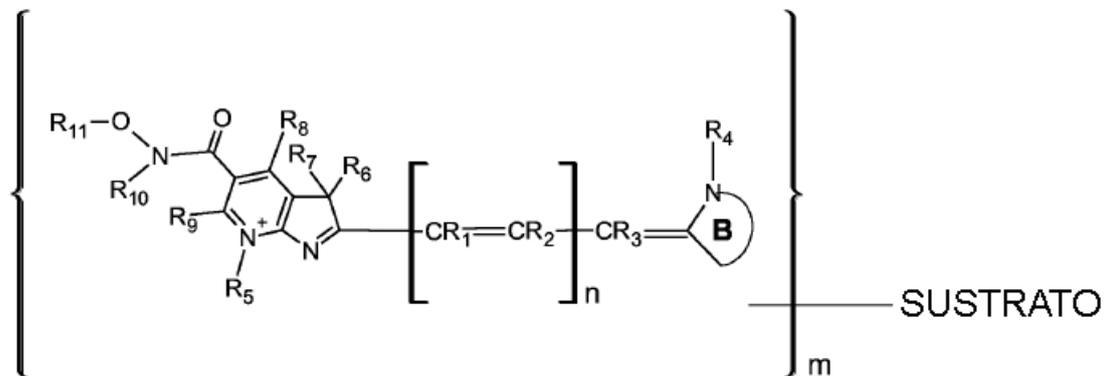
25 30. El compuesto según la Cláusula 5, en donde el compuesto se describe mediante alguna de las siguientes estructuras:





31. Un conjugado de tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato, que comprende: un grupo 5-hidroxamato-azaindolina unido a un anillo heterocíclico de 5 miembros a través de un grupo de unión de polimetino divalente, en donde uno o más del grupo 5-hidroxamato-azaindolina, grupo de unión de polimetino divalente y el anillo heterocíclico de 5 miembros, se conjuga a un sustrato.

32. El conjugado de tinte según la Cláusula 31, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula VII:



Fórmula VII

en donde:

10 el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene

5 nitrógeno y, que comprende además de cero a tres anillos aromáticos fusionados; en donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y, los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo), y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos se sustituyen opcionalmente con uno o más sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltilio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, y un L-SUSTRATO;

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

10 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos; un arilalquilo, un heteroalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

15 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

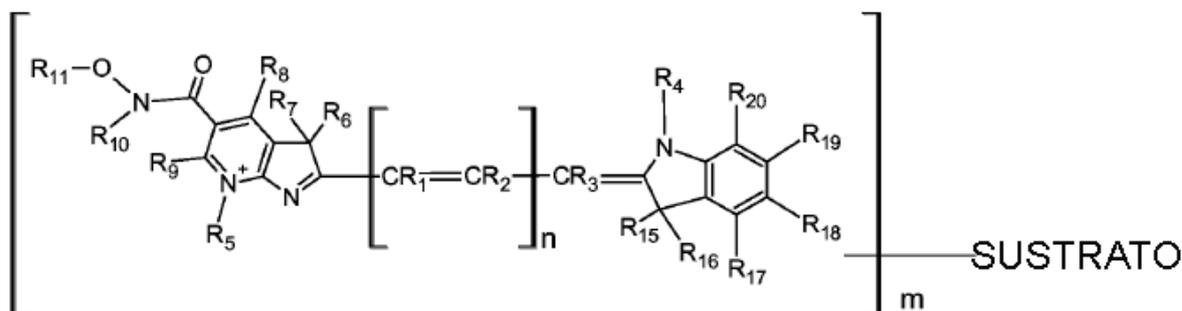
20 R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltilio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte; y

el SUSTRATO es una molécula biológica.

25 33. El conjugado de tinte según la Cláusula 32, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula VIII:



Fórmula VIII

en donde:

n es de 0 a 3;

30 m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

35 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos; un arilalquilo, un heteroalquilo, un carboxialquilo, carboxilarilo o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo,

un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte; y

- 5 el SUSTRATO es una molécula biológica, bien un ligando bioactivo pequeño, o un biopolímero; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>20</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

34. El conjugado de tinte según la Cláusula 33, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

- 10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> y R<sub>20</sub> son un hidrógeno cada uno;

- 15 R<sub>18</sub> es azufre; y

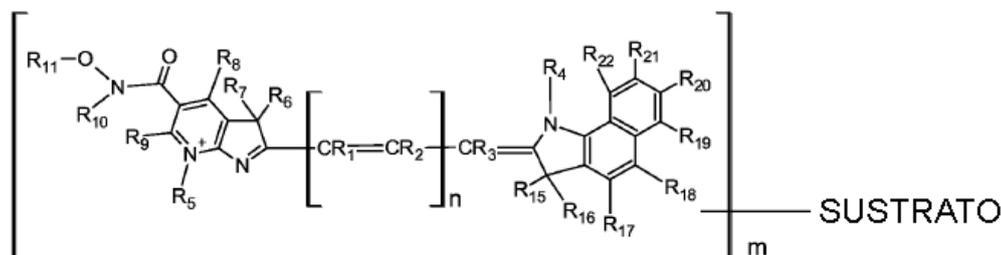
R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

35. El conjugado de tinte según la Cláusula 33, en donde L es nulo, es un alquilo, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, una poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo.

- 20 36. El conjugado de tinte según la Cláusula 33, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

37. El conjugado de tinte según la cláusula 33, en donde el SUSTRATO es un anticuerpo.

38. El conjugado de tinte según la Cláusula 32, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula IX:



Fórmula IX

- 25 en donde:

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

- 30 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

- 35 R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

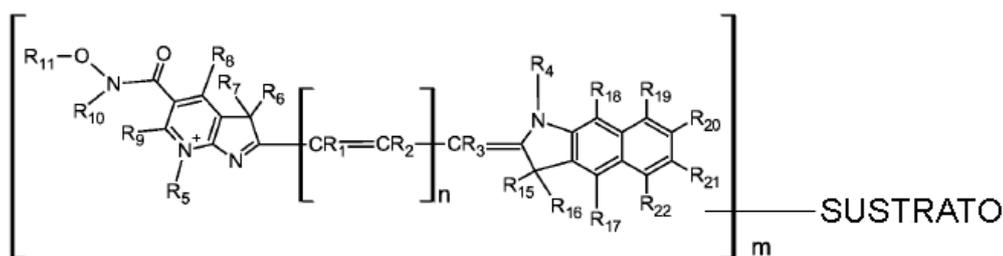
R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

- 5 opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

39. El conjugado de tinte según la cláusula 32, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula X:



Fórmula X

10 en donde:

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

- 15 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

- 20 R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

- 25 R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

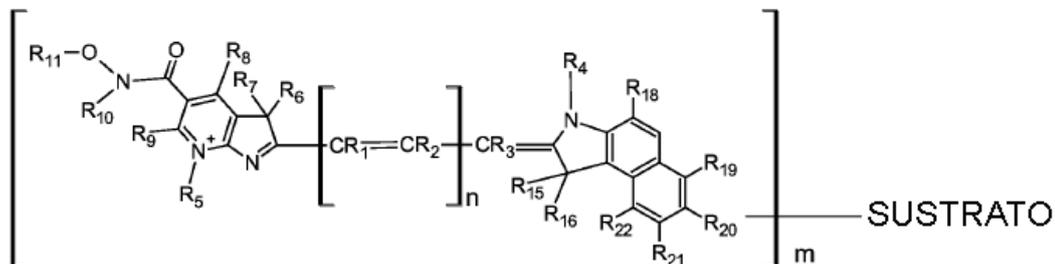
L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

30

40. El conjugado de tinte según la Cláusula 32, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula XI:



Fórmula XI

en donde:

5 n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

20 L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

41. El conjugado de tinte según la Cláusula 40, en donde:

25 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfonilalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, carboxilarilo, sulfonilalquilo, o un L-SUSTRATO;

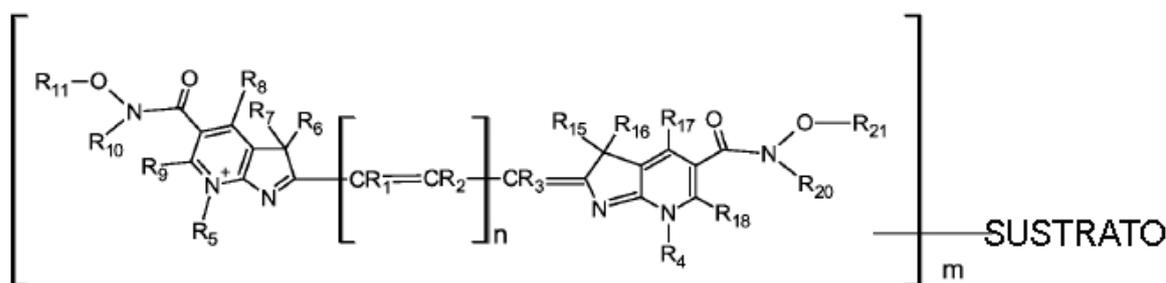
30 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, o un sulfato; y

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

42. El conjugado de tinte según la cláusula 40, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

43. El conjugado de tinte según la cláusula 40, en donde el SUSTRATO es un anticuerpo.

44. El conjugado de tinte según la cláusula 32, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula XII:



Fórmula XII

en donde:

n es de 0 a 3;

5 m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>20</sub> y R<sub>21</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

20 el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

45. El conjugado de tinte según la Cláusula 44, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

25 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO; R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son hidrógeno, o sulfonato; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son un alquilo, o un L-SUSTRATO.

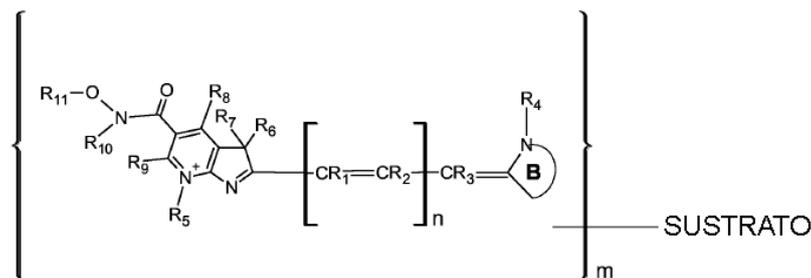
30 46. El conjugado de tinte según la Cláusula 44, en donde L es nulo, es un alquilo, un polietilenglicol, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, una poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo.

47. El conjugado de tinte según la Cláusula 44, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

48. El conjugado de tinte según la Cláusula 44, en donde el SUSTRATO es un anticuerpo.

35 49. Un método de detección de un analito en una muestra, el método comprende:

a) poner en contacto la muestra con un reactivo de detección que comprende un conjugado de tinte descrito mediante la Fórmula VII bajo condiciones en las que el reactivo de detección forma un complejo con el analito;



Fórmula VII

en donde:

5 el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno y comprende además, de cero a tres anillos aromáticos fusionados; donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y de los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo), N(acilo) y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros y de los cero a tres anillos aromáticos se sustituyen opcionalmente con uno o más sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonilo, y un L-SUSTRATO;

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

15 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

20 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

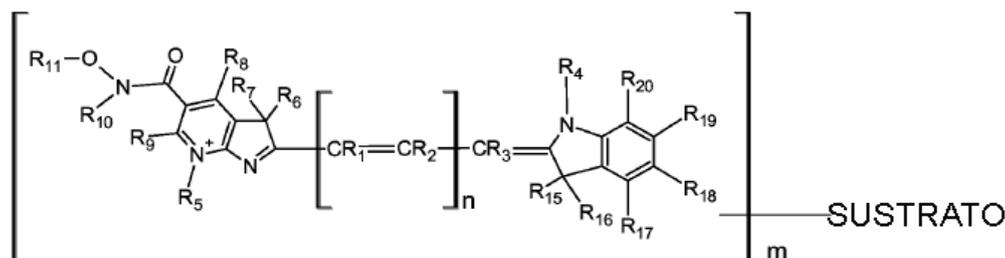
R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

25 R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

b) detectar el complejo mediante fluorescencia.

50. El método según la Cláusula 49, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula VIII:



30

Fórmula VIII

en donde:

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

5 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxiarilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

15 L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>20</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

51. El método según la Cláusula 50, en donde:

20 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;

25 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>, R<sub>19</sub> y R<sub>20</sub> son un hidrógeno cada uno;

R<sub>18</sub> es sulfonato; y

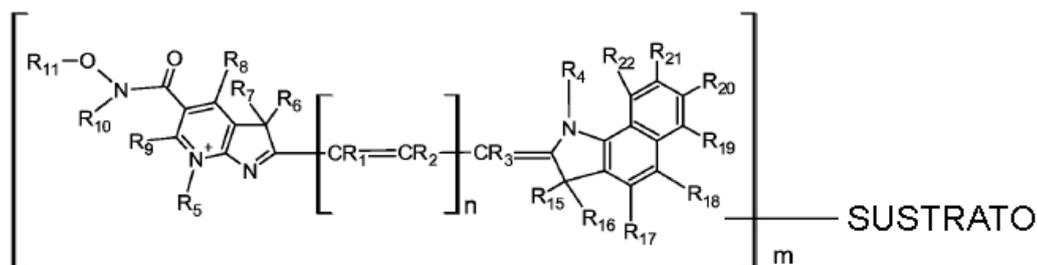
R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

52. El método según la Cláusula 50, en donde L es nulo, es un alquilo, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, una poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo.

30 53. El método según la Cláusula 50, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

54. El método según la Cláusula 50, en donde el SUSTRATO es un anticuerpo.

55. El método según la Cláusula 49, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula IX:



Fórmula IX

35 en donde:

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

5 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilaquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

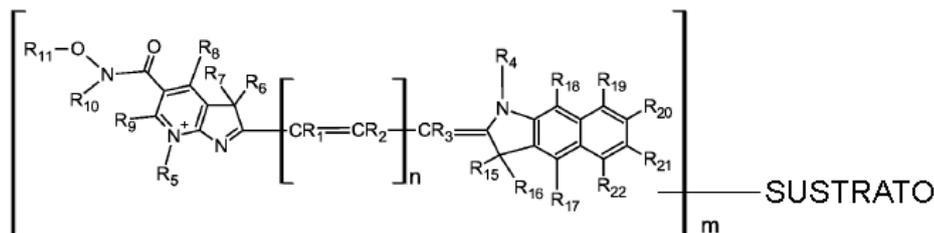
R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

15 L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

56. El método según la Cláusula 49, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula X:



20

Fórmula X

en donde:

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

25 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

30 R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

35 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

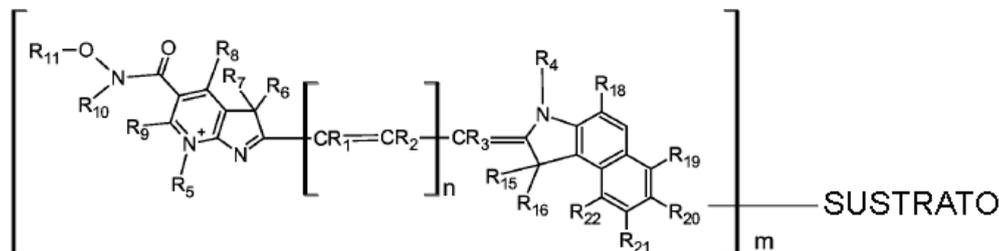
R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno un hidrógeno, alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

57. El método según la Cláusula 49, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula XI:



Fórmula XI

en donde:

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

58. El método según la Cláusula 57, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfonilalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfonilalquilo, o un L-SUSTRATO;

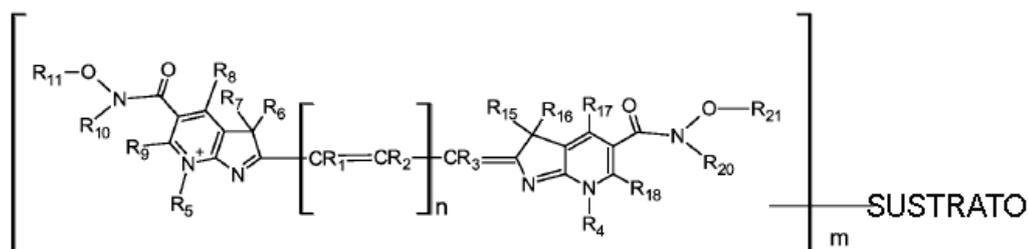
R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, o un sulfonato; y

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

59. El método según la Cláusula 57, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

60. El método según la Cláusula 57, en donde el SUSTRATO es un anticuerpo.

61. El método según la Cláusula 49, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula XII:



Fórmula XII

en donde:

n es de 0 a 3;

5 m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>20</sub> y R<sub>21</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

20 el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

62. El método según la Cláusula 61, en donde:

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son un hidrógeno cada uno;

25 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, o un sulfonato; y

30 R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un alquilo, o un L-SUSTRATO.

63. El método según la Cláusula 61, en donde L es nulo, es un alquilo, un alcoxilo, un tioalquilo, un aminoácido, un sulfoaminoácido, poliamina, un polietilenglicol, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, o un heteroarilo.

64. El método según la Cláusula 61, en donde L es nulo, es un alquilo, o un polietilenglicol.

65. El método según la Cláusula 61, en donde el SUSTRATO es un anticuerpo.

35 66. El método de la Cláusula 49, en donde el agente de detección comprende un conjugado en tándem.

67. Un método para detectar un analito en una muestra, el método comprende:

poner en contacto la muestra con un compuesto de tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato de la Cláusula 1, bajo condiciones suficientes como para conjugar el tinte con el analito y producir un conjugado de analito

marcado; y

detectar el analito marcado mediante fluorescencia.

68. El método según la Cláusula 67, que comprende además separar de la muestra el analito marcado.

69. Un kit que comprende:

- 5 un compuesto de tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato según la Cláusula 31; y uno o más componentes que se seleccionan de un conjugado de tinte, un sustrato, un analito, una célula, un soporte, un resto de unión específico, un tampón, un reactivo, una fuente de luz e instrucciones para usar los compuestos de tinte reactivos.

70. Un kit que comprende:

- 10 un conjugado de tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato según la Cláusula 31; y uno o más componentes que se seleccionan de un compuesto de tinte, un sustrato, un analito, una célula, un soporte, un resto de unión específico, un tampón, un reactivo, una fuente de luz e instrucciones para usar los conjugados de tinte.

71. El kit según la Cláusula 70, en donde el conjugado de tinte comprende un conjugado APC de tinte.

- 15 72. Un sistema fluídico analítico que comprende un instrumento fluídico analítico y una muestra, en donde la muestra comprende un tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato.

73. El sistema fluídico analítico según la Cláusula 72, en donde la muestra comprende el tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato según la Cláusula 1.

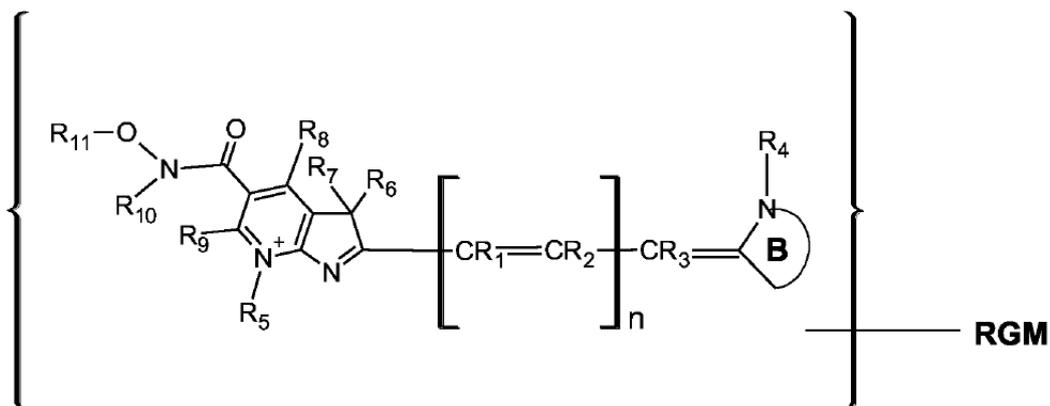
74. El sistema fluídico analítico según la Cláusula 72, en donde la muestra comprende el conjugado de tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato según la Cláusula 31.

- 20 75. El sistema fluídico analítico según la Cláusula 72, en donde el instrumento fluídico analítico comprende un citómetro de flujo.

La anterior invención se ha descrito en detalle a modo de ejemplo e ilustración, con fines de claridad y entendimiento.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato, que comprende un grupo 5-hidroxamato-azaindolina unido a un anillo heterocíclico de 5 miembros a través de un grupo de unión de polimetino divalente, en donde uno más de los grupos de 5-hidroxamato-azaindolina, del grupo de unión de polimetino divalente y del anillo heterocíclico de 5 miembros, se sustituye por un resto del grupo reactivo (RGM).
2. El compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula I:



Fórmula I

en donde:

- 10 el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno y comprende además de cero a tres anillos aromáticos fusionados; en donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y, los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo) y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos fusionados se sustituyen opcionalmente con uno más sustituyentes que se
- 15 seleccionan del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tior, un sulfonato, un fosfonilo, y un L-RGM;

n es de 0 a 3;

- 20 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tior, un alquiltior, un ariltior, un heteroariltior, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonialquilo, un sulfonialquilo, o un L-RGM;

- R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

- 25 R<sub>6</sub>-R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un fosfonialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

- 30 R<sub>8</sub>-R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tior, un sulfonato, un fosfonilo o un L-RGM;

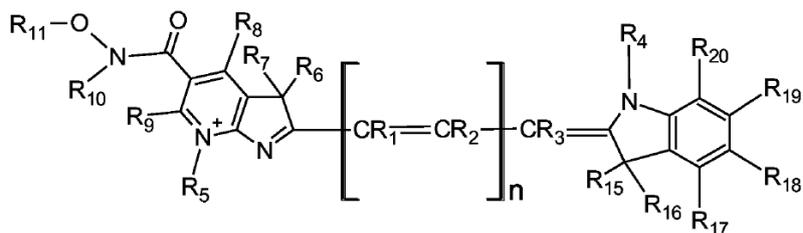
R<sub>10</sub>-R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

RGM es un grupo reactivo químicamente; y

L es un enlazador,

- 35 o

en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula II:



Fórmula II

en donde:

n es de 0 a 3;

5 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

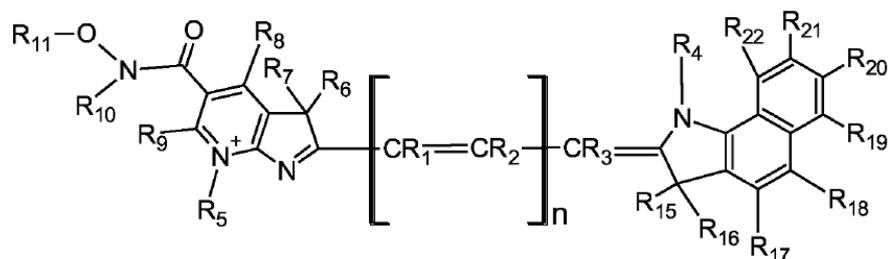
15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

20 opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

3. El compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula III:



Fórmula III

25 en donde:

n es de 0 a 3;

30 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-

20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un fosfonilalquilo, un sulfonilalquilo, o un L-RGM;

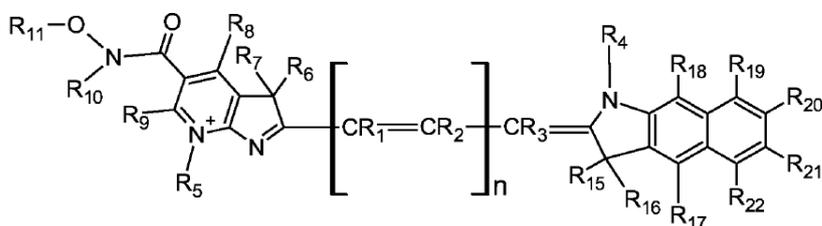
- 5  $R_8$ ,  $R_9$ , y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcóxido que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

- 10 opcionalmente, uno más  $R_4$  y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_5$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{22}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros, o

en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula IV:



Fórmula IV

en donde:

- 15  $n$  es de 0 a 3;

$R_1$ - $R_3$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcóxido, un arilóxido, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, sulfonilalquilo, o un L-RGM;

- 20  $R_4$  y  $R_5$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, un fosfonilalquilo o un L-RGM;

$R_6$ ,  $R_7$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$  son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

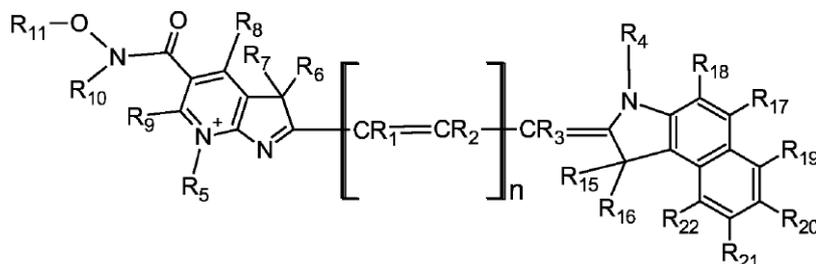
- 25  $R_8$ ,  $R_9$  y  $R_{17}$ - $R_{22}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcóxido que tiene 1-20 carbonos, trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;  $R_{10}$  y  $R_{11}$  son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonilalquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

RGM es un grupo reactivo químicamente;

- 30 L es un enlazador ;y

opcionalmente, uno o más de  $R_4$  y  $R_5$ ,  $R_6$  y  $R_7$ ,  $R_5$  y  $R_9$ ,  $R_{15}$  y  $R_{16}$ ,  $R_4$  y  $R_{18}$ ,  $R_4$  y  $R_6/R_7$ , o  $R_6/R_7$  y  $R_{15}/R_{16}$  podrían tomarse en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

4. El compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula V:



Fórmula V

en donde:

5 n es de 0 a 3;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, un fosfonialquilo, un sulfonialquilo, o un L-RGM;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un fosfonialquilo, un sulfonialquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, carboxilarilo, un fosfonialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, un fosfonialquilo, o un L-RGM;

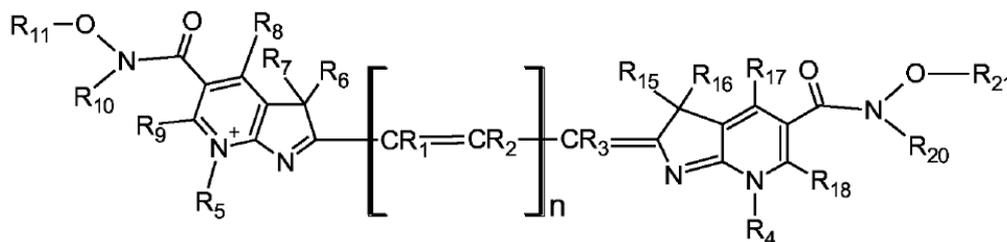
20 RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros,

o

25 en donde el compuesto se describe mediante la Fórmula VI:



Fórmula VI

en donde:

n es de 0 a 3;

30 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20

carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

5 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilio, un carbonilo, un amino, un tiol, un sulfonato, un fosfonilo, o un L-RGM;

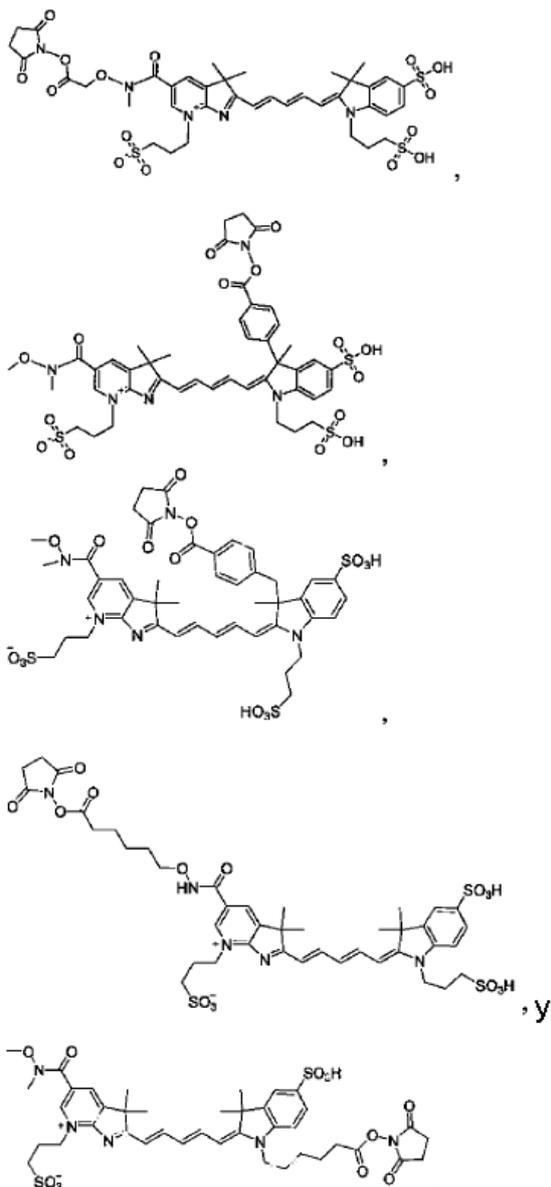
R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>20</sub> y R<sub>21</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un sulfoalquilo, o un L-RGM;

10 RGM es un grupo reactivo químicamente;

L es un enlazador; y

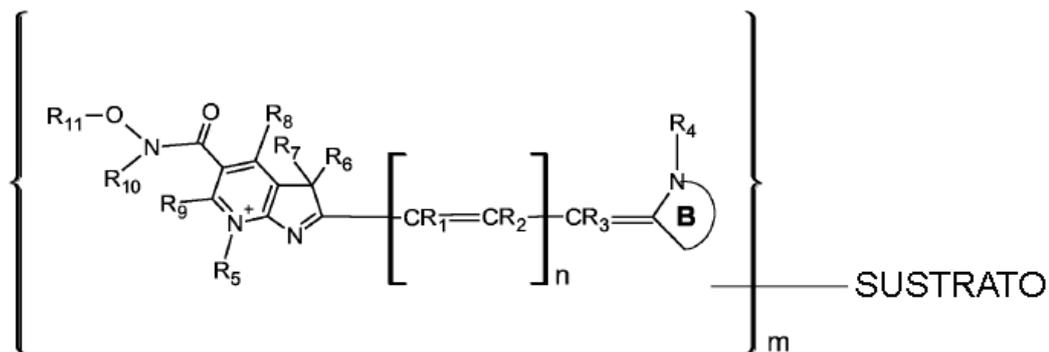
opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

15 5. El compuesto según la reivindicación 1, en donde el compuesto se describe mediante una de las siguientes estructuras:



6. Un conjugado de tinte de cianina-azaindolina sustituida con 5-hidroxiato, que comprende: un grupo 5-hidroxiato-azaindolina unido a un anillo heterocíclico de 5 miembros a través de un grupo de unión de polimetino divalente, en donde uno o más de los grupos 5-hidroxiato-azaindolina, del grupo de unión de polimetino divalente y el anillo heterocíclico de 5 miembros se conjuga con el sustrato.

5 7. El conjugado de tinte según la Reivindicación 6, en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula VII:



Fórmula VII

en donde:

10 el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno e incluye además, de cero a tres anillos aromáticos fusionados; en donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y de los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan independientemente del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo) y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros y los cero a tres anillos aromáticos se sustituyen opcionalmente con uno o más sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, y un L-SUSTRATO.

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

20 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

25 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

30 R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonilo, o un L-SUSTRATO;

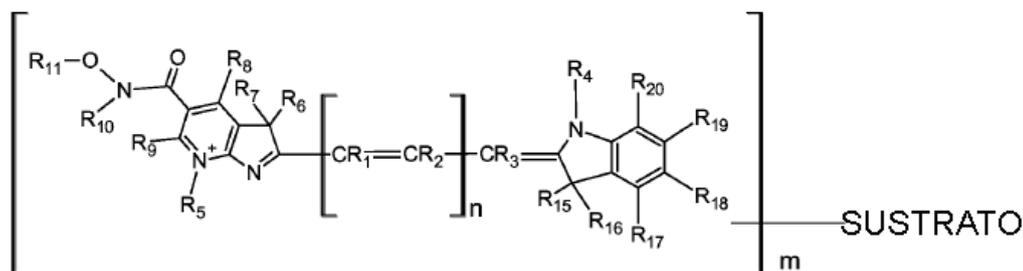
R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador; y

el SUSTRATO es una molécula biológica,

35 o

en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula VIII:



Fórmula VIII

en donde:

n es de 0 a 3;

5 m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

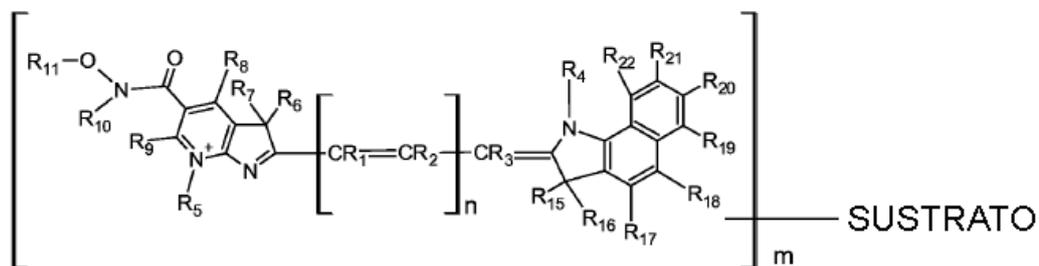
15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>20</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonilo, o un L-SUSTRATO; R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica, bien un ligando bioactivo pequeño, o bien un biopolímero; y

20 opcionalmente, uno o más de R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>20</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

8. El conjugado de tinte según la reivindicación 6 en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula IX:



Fórmula IX

25 en donde:

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

30 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20

carbonos, un arilalquilo, un heteroalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

- 5 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

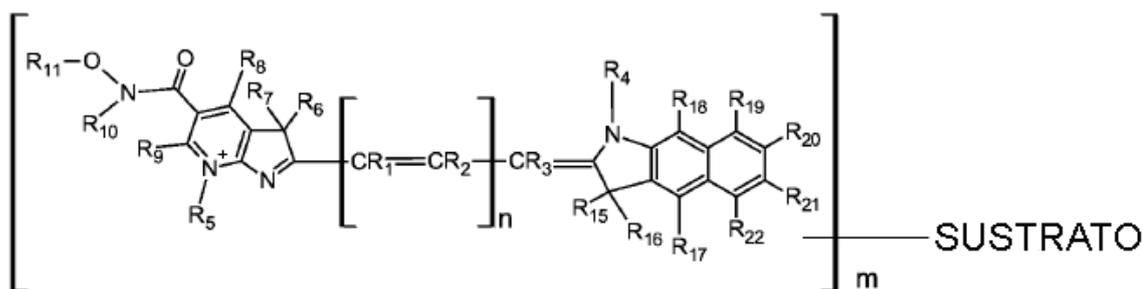
- 10 L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>22</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros,

o

- 15 en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula X:



Fórmula X

en donde:

n es de 0 a 3;

- 20 m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-RGM;

- 25 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

- 30 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

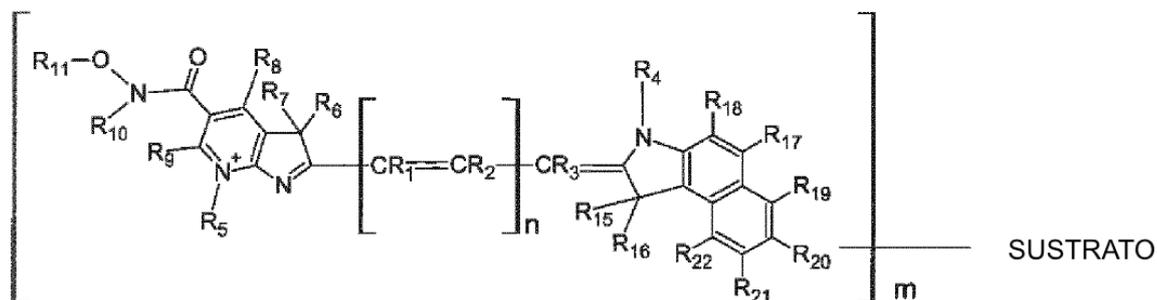
R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

- 35 el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

9. El conjugado de tinte según la Reivindicación 6, en donde el conjugado se describe mediante la Fórmula XI:



Fórmula XI

en donde:

5 n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

15 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> y R<sub>17</sub>-R<sub>22</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

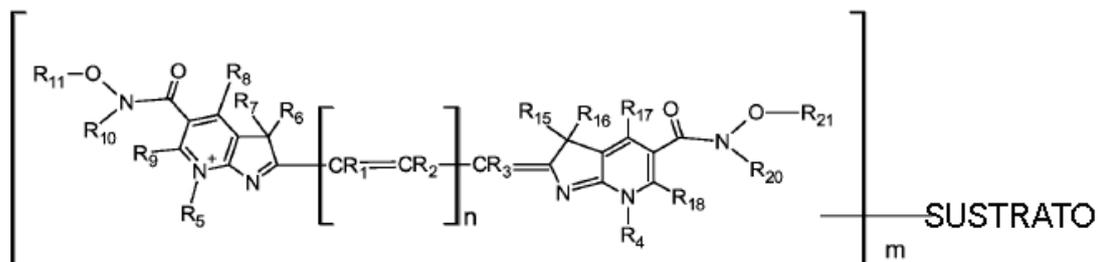
20 L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros,

o

25 en donde el conjugado de tinte se describe mediante la Fórmula XII:



Fórmula XII

en donde:

n es de 0 a 3;

30 m es de 1 a 50;

R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

5 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

10 R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>17</sub> y R<sub>18</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub>, R<sub>11</sub>, R<sub>20</sub> y R<sub>21</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

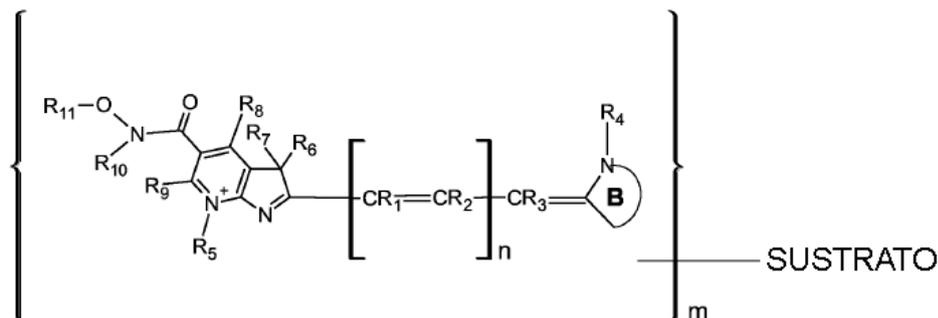
L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

15 el SUSTRATO es una molécula biológica; y

opcionalmente, uno o más de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>9</sub>, R<sub>15</sub> y R<sub>16</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>18</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub>, o R<sub>6</sub>/R<sub>7</sub> y R<sub>15</sub>/R<sub>16</sub> se toman en combinación para formar un anillo de 5 a 50 miembros.

10. Un método para detectar un analito en una muestra, el método comprende:

20 a) poner en contacto la muestra con un reactivo de detección que comprende un conjugado de tinte descrito mediante la Fórmula VII bajo condiciones en las que el reactivo de detección forma un complejo con el analito;



Fórmula VII

en donde:

25 el anillo B representa los átomos necesarios para formar un anillo heterocíclico de cinco miembros que contiene nitrógeno y comprende además, de cero a tres anillos aromáticos fusionados; donde cada átomo del anillo heterocíclico de cinco miembros y de los cero a tres anillos aromáticos fusionados se seleccionan del grupo que consiste en C, CH, C(alquilo), C(arilo), O, S, N, N(arilo) y N(alquilo), y el anillo heterocíclico de cinco miembros y de los cero a tres anillos aromáticos se sustituyen opcionalmente con uno o más sustituyentes que se seleccionan del grupo que consiste en un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcoxilo que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metiltio, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonilo, y un L-SUSTRATO;

n es de 0 a 3;

m es de 1 a 50;

35 R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo, un amino, un alquilamino, un arilamino, un tiol, un alquiltiol, un ariltiol, un heteroariltiol, un polietilenglicol, un alcoxilo, un ariloxilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tienen 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20 carbonos, un arilalquilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son cada uno independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un cicloalquilo que tiene 3-20

carbonos, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, un carboxilarilo, o un L-SUSTRATO;

5 R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un hidroxilo, un alcóxido que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilo, un sulfonato, un carbonilo, un amino, un tiol, un fosfonato, o un L-SUSTRATO;

R<sub>10</sub> y R<sub>11</sub> son cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un arilo, un arilalquilo, un heteroarilo, un heteroarilalquilo, un carboxialquilo, o un L-SUSTRATO;

L es un enlazador entre el SUSTRATO y el tinte;

b) detectar el complejo mediante fluorescencia.

10 11. El uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-9, para detectar un analito en una muestra.

12. Un método para detectar un analito en una muestra, el método que comprende:

15 poner en contacto la muestra con un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-9, preferiblemente el compuesto de tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato de la Reivindicación 1, bajo condiciones suficientes para conjugar el tinte con el analito y producir un conjugado de analito marcado; y

detectar el analito marcado mediante fluorescencia.

13. Un kit que comprende:

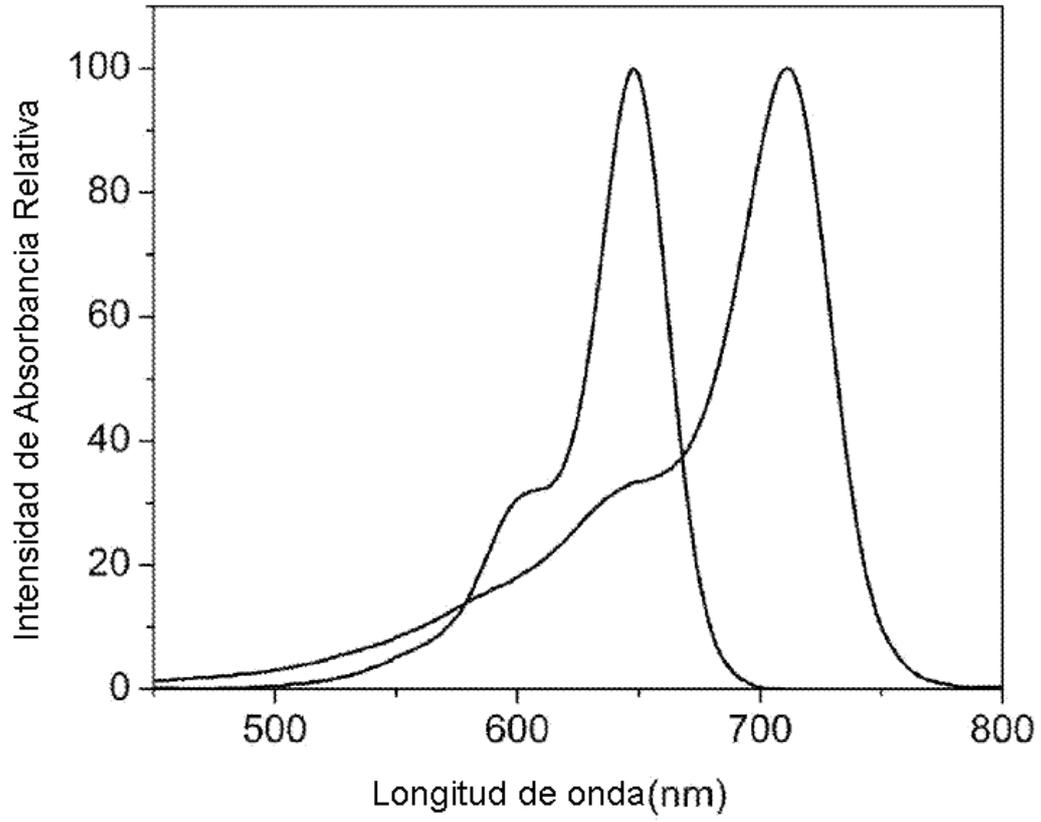
un tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y

20 uno o más componentes que se seleccionan de conjugados de tinte, un sustrato, un analito, una célula, un soporte, un resto de unión específico, un tampón, un reactivo, una fuente de luz e instrucciones para usar los compuestos de tinte reactivo.

14. Un sistema fluido analítico que comprende un instrumento fluido analítico y una muestra, en donde la muestra comprende un tinte de cianina-azaindolina sustituido con 5-hidroxamato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-9.

25 15. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1-9 para emplear en diagnóstico.

**FIG. 1**



**FIG. 2**

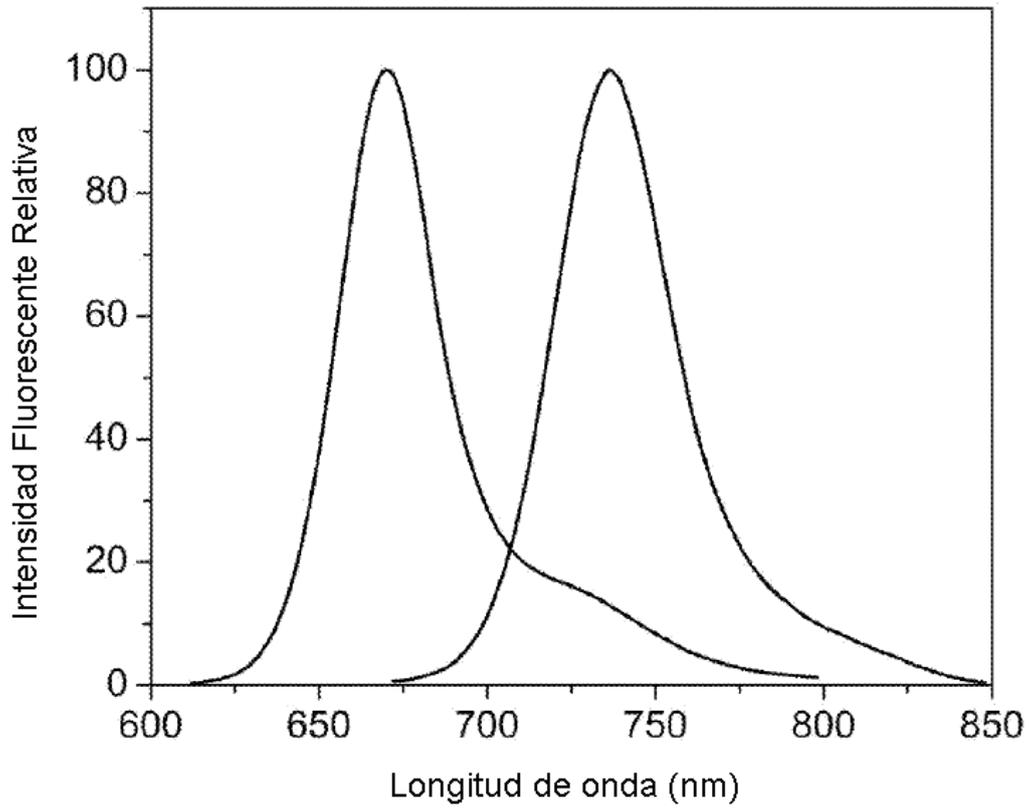
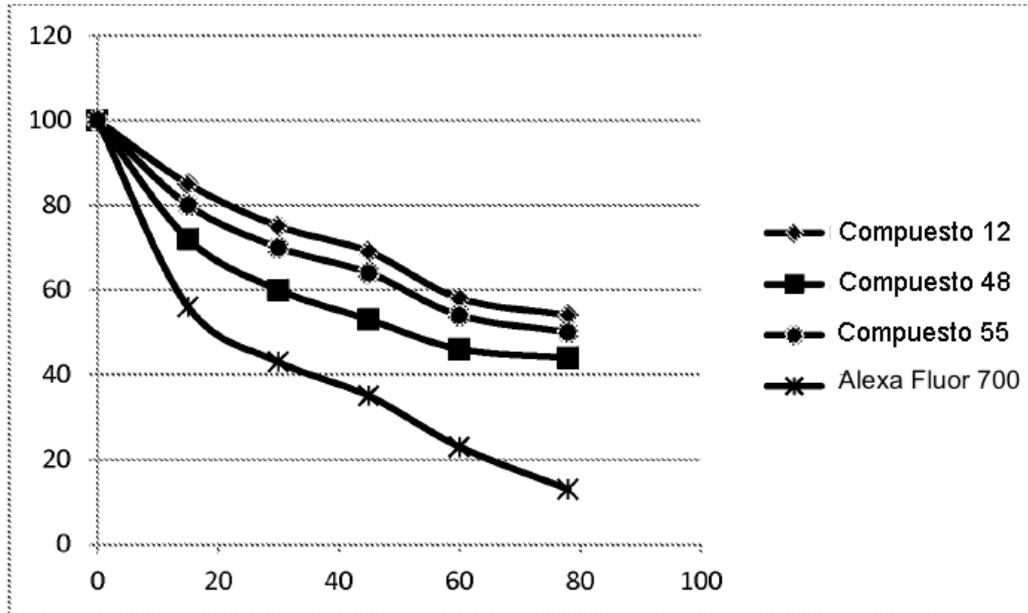


FIG. 3



**FIG. 4**

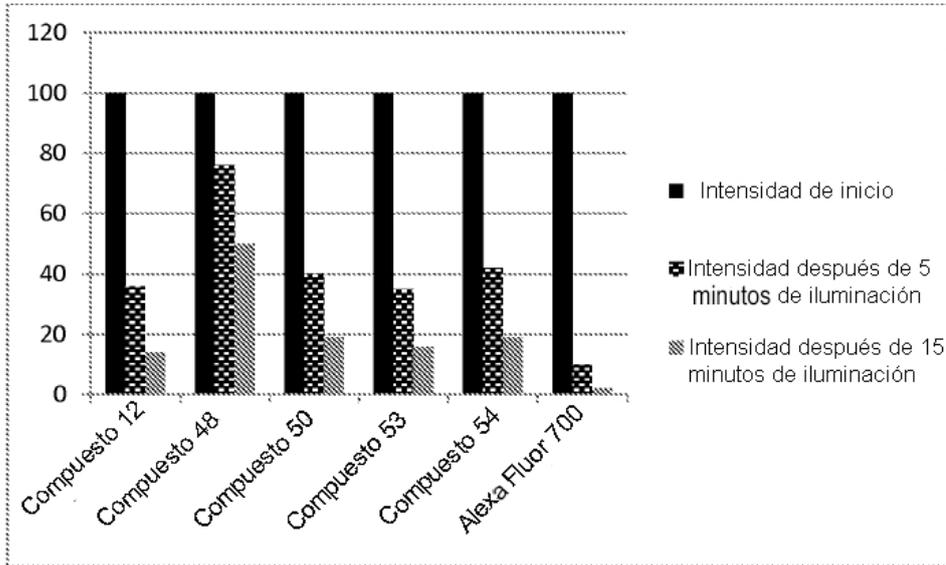


FIG. 5

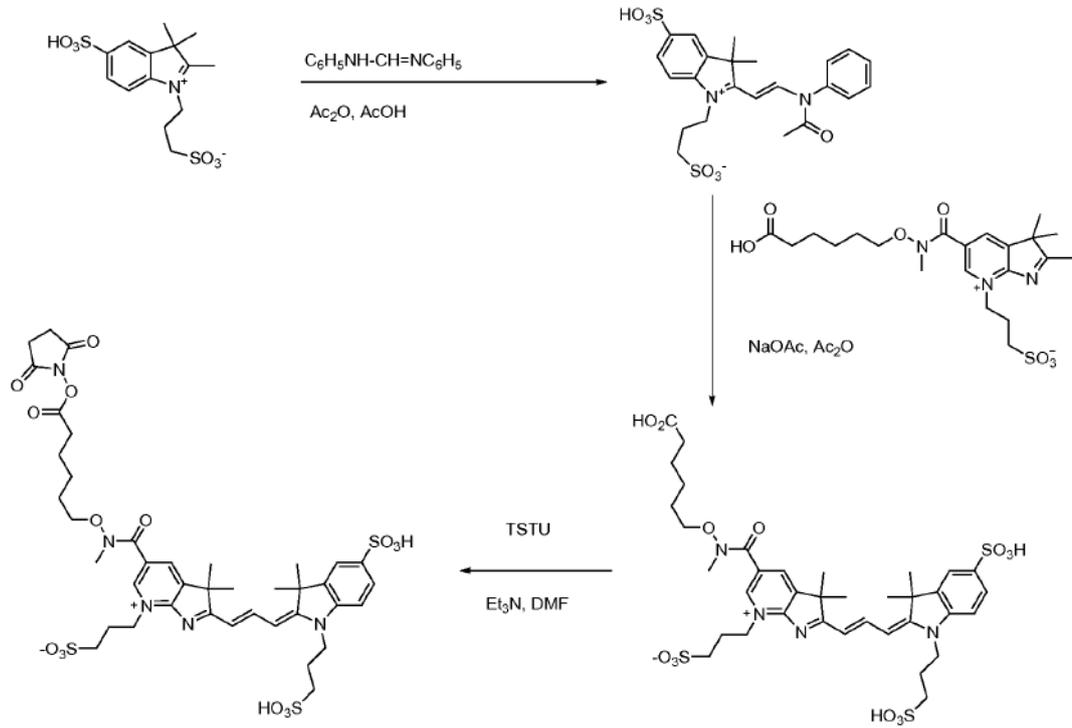


FIG. 6

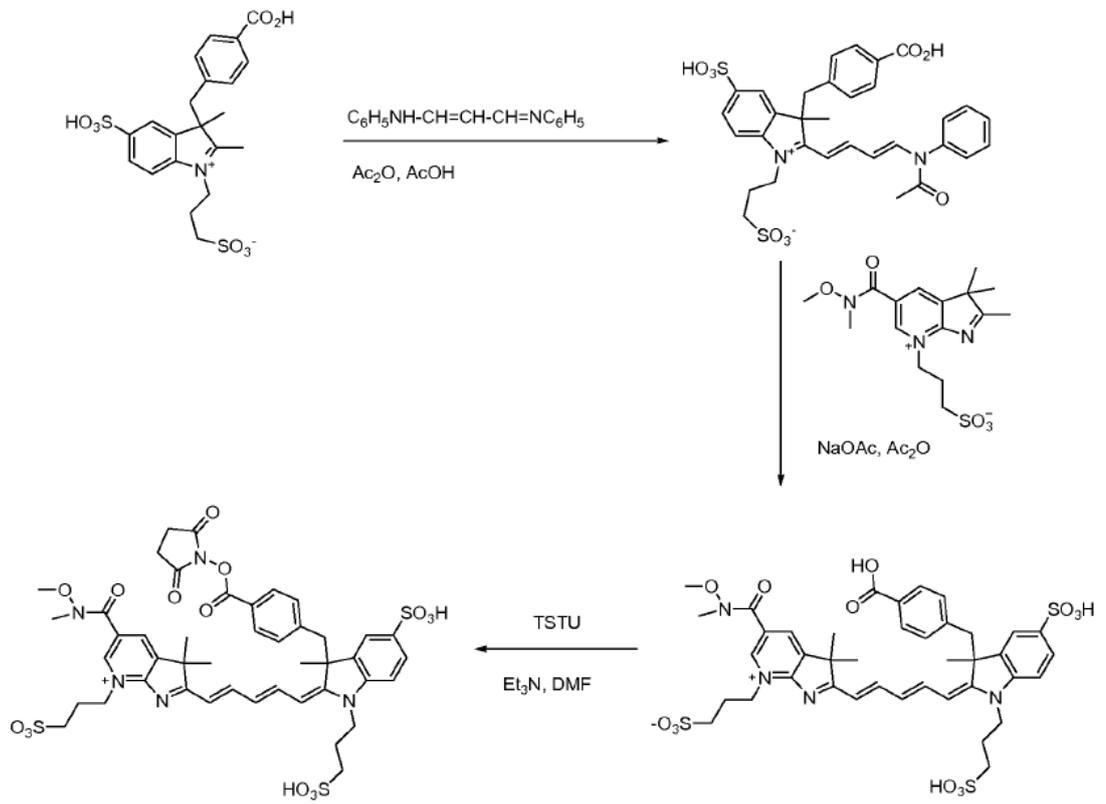
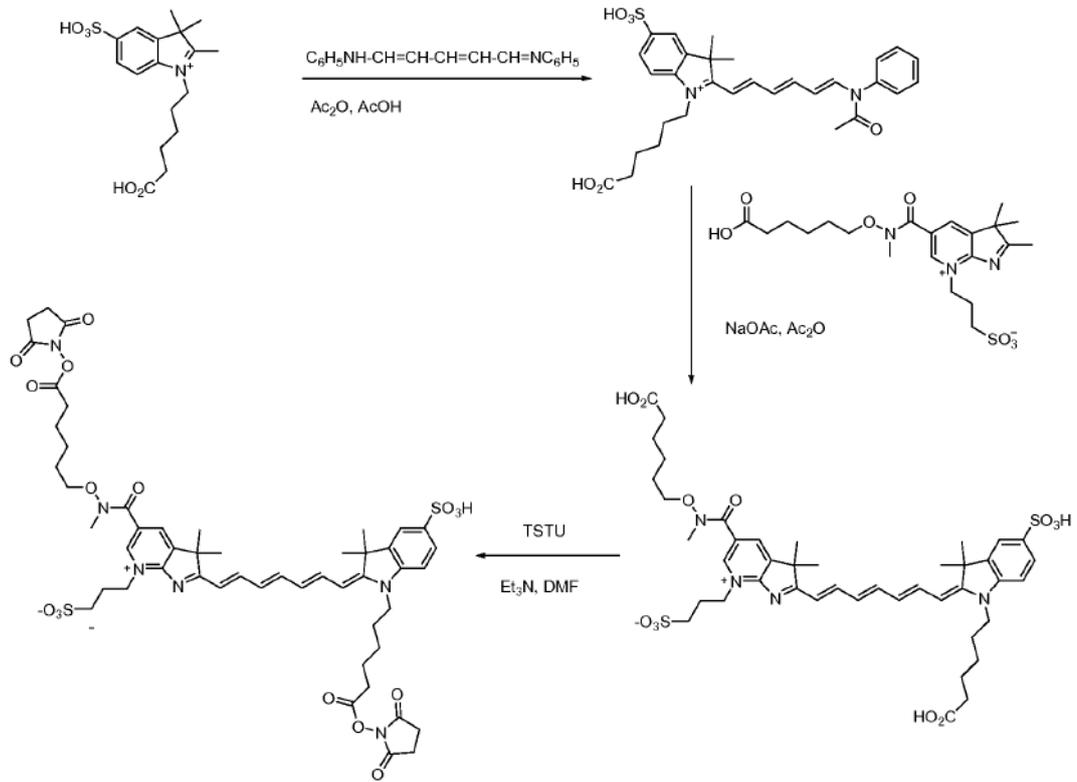
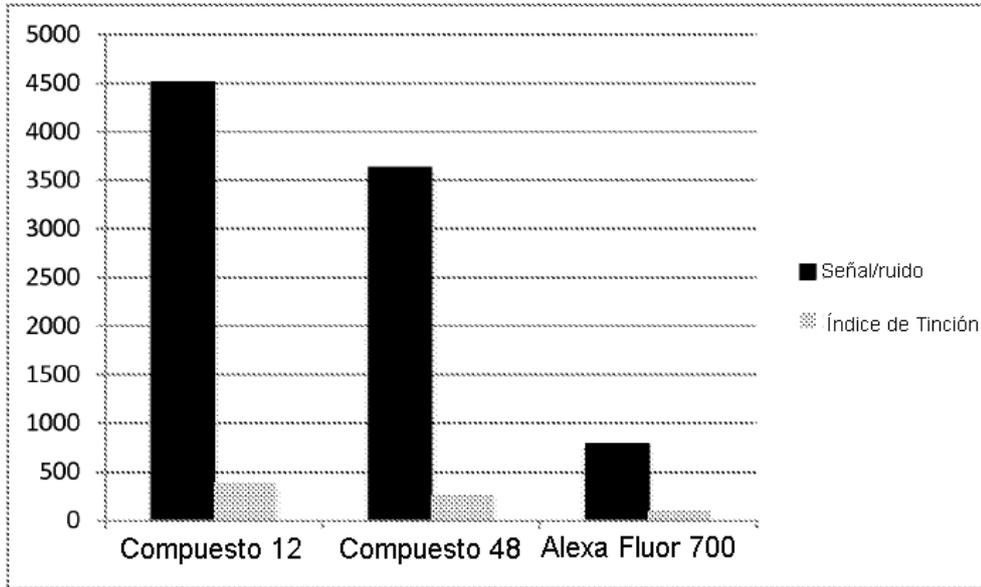


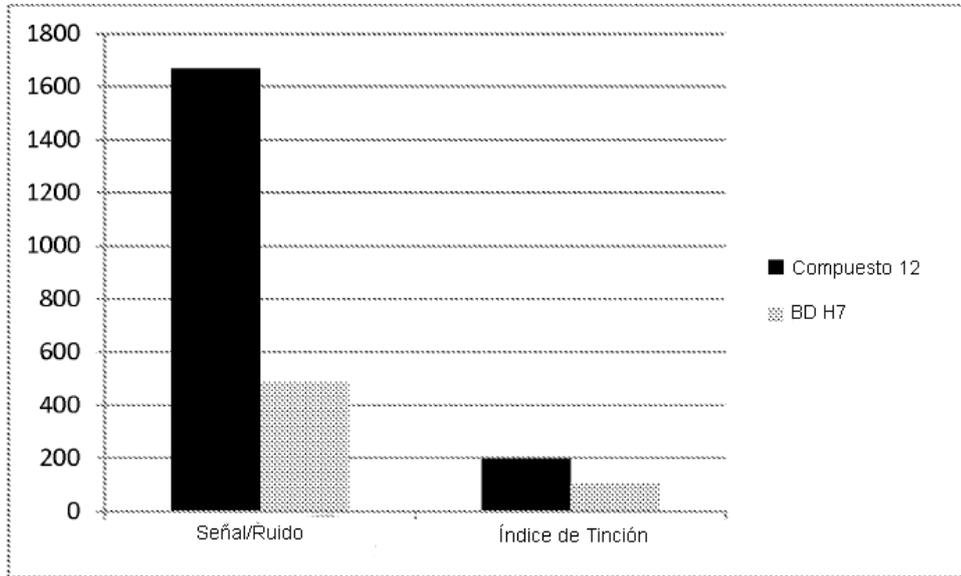
FIG. 7



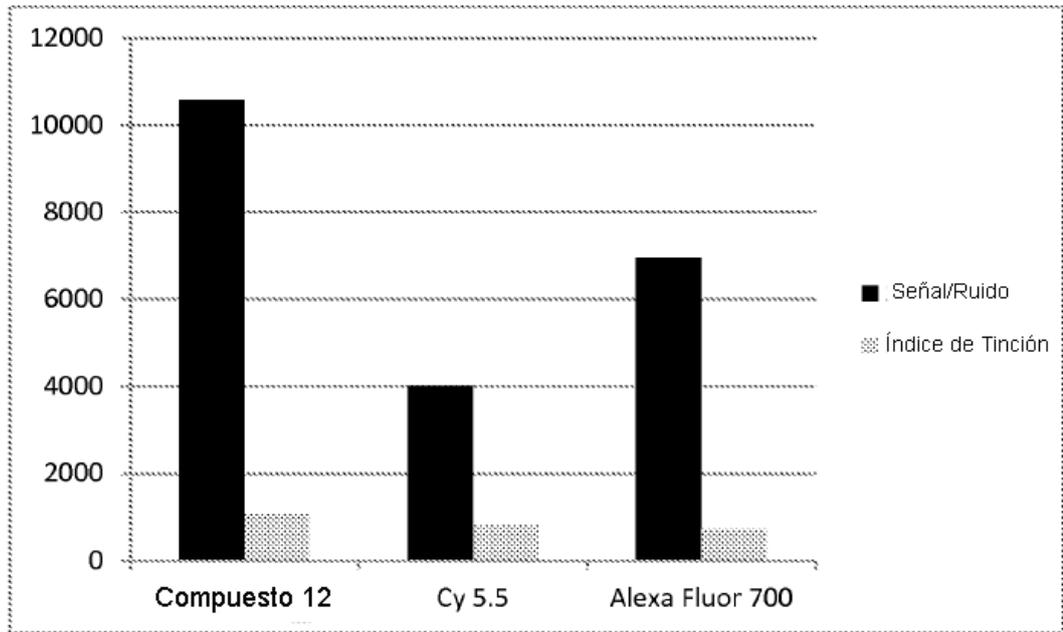
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

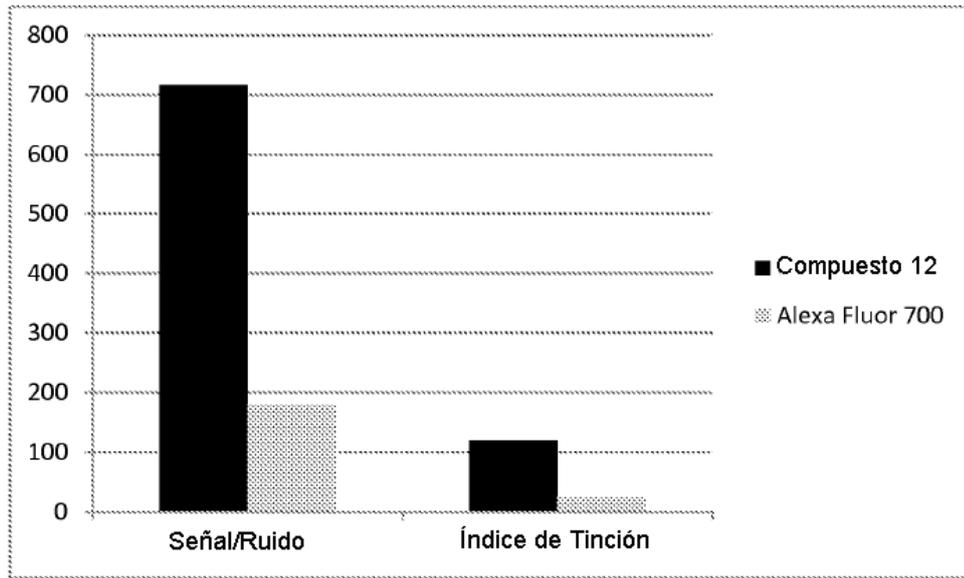
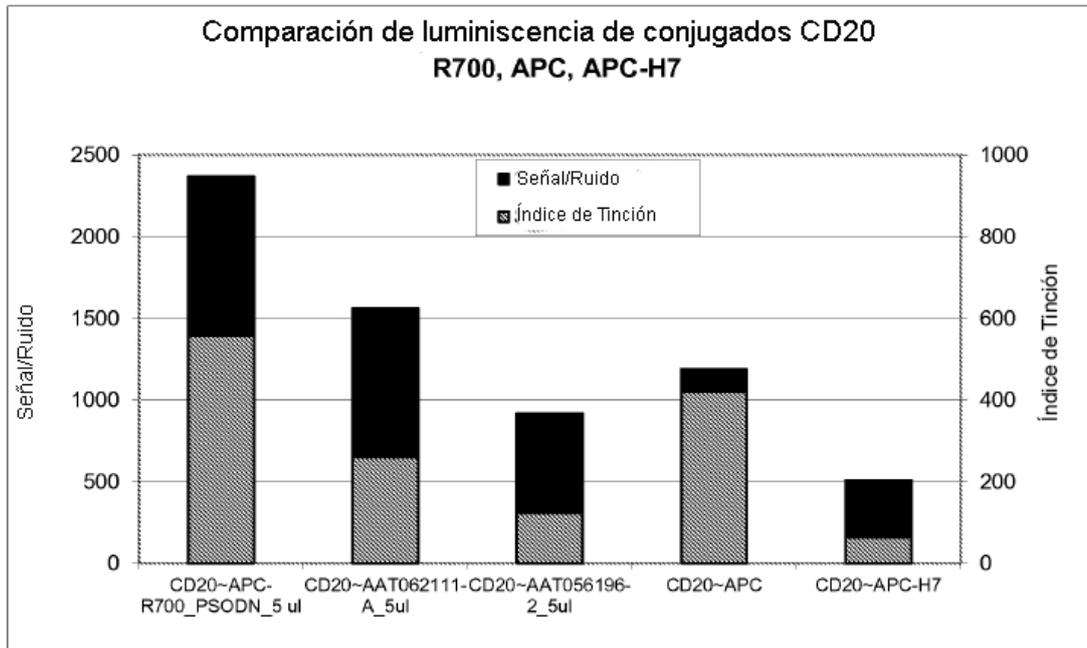
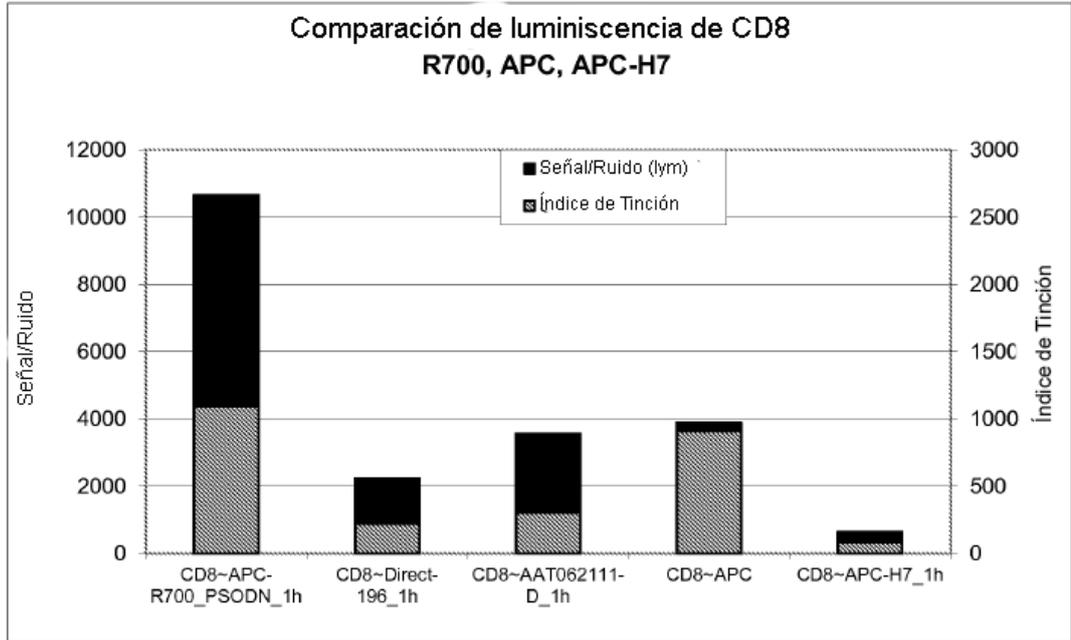


FIG. 12



**FIG. 13**

