

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 667**

51 Int. Cl.:

**C07D 209/60** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2006 PCT/FR2006/001947**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2007 WO07017602**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2006 E 06794328 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 1981846**

54 Título: **Marcadores, su procedimiento de fabricación y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

**11.08.2005 FR 0508525**

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

**06.03.2018**

73 Titular/es:

**LABORATOIRES SYNTH-INNOVE (100.0%)  
2BIS, RUE DU PONT DE L'EURE  
F-75020 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**SCHERNINSKI, FRANÇOIS;  
GUYON, VINCENT y  
RAGER, MARIE-NOËLLE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 657 667 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

Marcadores, su procedimiento de fabricación y sus aplicaciones

### 5 Sector de la técnica

La presente invención tiene por objeto nuevos marcadores útiles para el marcado de moléculas diana. La invención también se refiere a un procedimiento para la obtención de estos marcadores. Por último, se refiere a la aplicación de estos nuevos marcadores para la detección y/o la cuantificación de moléculas diana.

10

### Estado de la técnica

El marcado de una molécula diana y, en particular, de moléculas biológicas por los marcadores presenta un gran interés en el campo de la biología celular y molecular, en particular en citología/histología, citometría de flujo, para la secuenciación de ácidos nucleicos. En el campo de la imagen médica, el uso de marcadores fluorescentes permite, entre otros, la localización de lesiones o tumores.

15

Los marcadores fluorescentes se usan ampliamente en biología, biofísica o fisiología no sólo para estudiar los procesos biológicos a nivel celular y molecular o cuantificar sustancias fisiológicas a analizar sino también en medicina en las técnicas de formación de imágenes no invasivas para la supervisión o el diagnóstico.

20

Algunos ejemplos específicos de aplicación de los marcadores fluorescentes en biología son:

- la identificación y la separación de una subpoblación de células en mezclas de células por las técnicas de citometría de flujo o microscopía,
- la determinación de la concentración de una sustancia que se fija a una segunda especie tal como un anticuerpo en un antígeno en técnicas de inmunoensayo, secuenciación de ácidos nucleicos, la puesta de manifiesto del emparejamiento de secuencias de nucleótidos,
- la localización de sustancias tales como ADN, las proteínas en geles de electroforesis u otros soportes insolubles por técnicas de tinción fluorescente.

25

30

En muchas técnicas, que incluyen la microscopía óptica de fluorescencia, es posible usar simultáneamente múltiples marcadores fluorescentes capaces de emitir a longitudes de onda diferentes. Este "multi-marcado" se realiza sin que se produzca confusión alguna entre las señales durante la detección.

35

El principio de multi-marcado también se usa en la técnica particular de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) que explota la transferencia de energía del estado excitado de un marcador fluorescente donante frente a un segundo marcador fluorescente aceptor, esta transferencia de energía sólo es posible cuando los dos marcadores están cerca. Esta técnica permite medir las interacciones (asociación o disociación) entre dos proteínas, una de las cuales está acoplada a un marcador fluorescente donante y la otra está acoplada a un fluorescente aceptor.

40

Sin embargo, durante estos multi-marcados, hay que tener en cuenta los posibles problemas de solapamiento parcial de los espectros de emisión de los marcadores usados que distorsionan la lectura de los resultados. Por lo tanto, durante el multi-marcado, es esencial limitar el fenómeno de superposición de espectros, lo que requiere tener acceso a un amplio intervalo de marcadores cuyas características espectrales son totalmente controladas.

45

### Objeto de la invención

El primer objeto de la presente invención consiste en nuevos marcadores compuestos de "colorantes funcionalizados", cuyo sistema de resonancia no se ve afectado por la funcionalización.

50

Por "colorante" se entiende cualquier sustancia coloreada, natural, artificial o sintética, que absorbe la luz en el campo del ultravioleta, visible y/o infrarrojo. En el contexto de la invención, los colorantes pueden ser fluorescentes. Por "colorantes fluorescentes", se designa colorantes que tienen la capacidad de excitarse de manera transitoria por absorción de una radiación luminosa después de regresar a su estado inicial emitiendo una radiación cuya longitud de onda es más elevada que la de la radiación de excitación.

55

Por "colorantes funcionalizados", se designa colorantes que poseen al menos una función química reactiva que permite su acoplamiento a moléculas diana y, opcionalmente, al menos una función que le permita ser solubles en condiciones de uso.

60

Los marcadores de la técnica anterior se pueden clasificar en tres categorías dependiendo de cómo su función química reactiva se vincula a la estructura cíclica del colorante.

65

Los marcadores de la primera categoría se definen por el hecho de que su función química reactiva está vinculada

directamente a un átomo de carbono de un anillo de la cadena principal hidrocarbonada del colorante. Se han descrito principalmente en los documentos US5.627.027, US2002/077487, FR2764605, US4.614.723, JP03133629, JP03133628, JP63277680, Masiero, S. *et al.* "G-quartets as a self-assembled scaffold or circular porphyrin arrays" *Chemical Communications*, vol.15, 2003 páginas 1995-1996, Yu, Junhua *et al.* "Porphyrin capped TiO<sub>2</sub> nanoclusters, tyrosine methyl ester enhanced electron transfer", documento FR2 748 027.

Sin embargo, el principal inconveniente de tales marcadores es que la función química reactiva se encuentra en proximidad inmediata de un anillo de la molécula de colorante. Esta proximidad conduce a un impedimento estérico significativo que dificulta en gran medida el acoplamiento a moléculas diana. Por otra parte, esta proximidad afecta a los espectros de absorción y fluorescencia del colorante. No obstante, la elección de un colorante para la síntesis de un marcador es dictada por sus propiedades espectrales. Por lo tanto, la obtención de un marcador cuya capacidad de acoplamiento se ve obstaculizada por el impedimento estérico y cuyas propiedades espectrales son diferentes de las del colorante seleccionado no es particularmente interesante.

Con el fin de superar los inconvenientes mencionados previamente, se desarrolló una segunda categoría de marcadores.

Los marcadores de esta segunda categoría se definen por el hecho de que su función química reactiva está conectada indirectamente a través de una cadena alquilo a un átomo perteneciente a la molécula del colorante inicial, este átomo no es un átomo de carbono. Se trata con frecuencia de un átomo de nitrógeno que, por lo general, pertenece a la estructura cíclica de este colorante.

La fabricación de estos marcadores de segunda categoría se limita al uso de colorantes constituidos principalmente por uno o más heterociclos de nitrógeno. Cada átomo de nitrógeno del colorante inicial transporta una cadena que influye fuertemente en la solubilidad del colorante; se trata a menudo de cadenas sulfoalquilo si el colorante debe ser solubilizado en medio acuoso o de cadenas alquilo si el colorante debe ser solubilizado en medio hidrófobo. La técnica de realización de los marcadores de esta segunda categoría consiste en reemplazar uno o más de estas cadenas alquilo o sulfoalquilo con una cadena hidrocarbonada que lleva la función química reactiva. Sin embargo, esta técnica tiene, como consecuencia, reducir notablemente la solubilidad del marcador con respecto a las características iniciales del colorante. Es más, la fabricación de los marcadores de esta segunda categoría sólo da acceso a un número muy limitado de entidades ya que es aplicable sólo a un número limitado de colorantes que constan de uno o más heteroátomos.

Por ejemplo, las patentes WO2005/058370, WO2003/082988, EP1209205 US 6.027.709 y US 6.224.644 desvelan marcadores de esta segunda categoría.

La patente US 6.027.709 describe colorantes de tipo carbocianina en los que una cadena sulfoalquilo ha sido reemplazada con una cadena alquilo que transporta una función ácido carboxílico (función química reactiva con carácter electrófilo).

La patente US 6.224.644 también describe carbocianinas modificadas de manera similar y destinadas a usarse como marcadores de moléculas biológicas. Sin embargo, estos marcadores son diferentes de los de la patente US 6.027.709 por el hecho de que la función química reactiva no es electrófila sino nucleófila (función hidroxilo, amina y tiol).

Esta categoría de marcadores presenta por lo tanto un interés limitado, ya que sólo se aplica a algunos colorantes de tipo carbocianina con una reducción de solubilidad del marcador relativamente a la del colorante inicial, mientras que hubiera sido deseable aumentar esta solubilidad para facilitar el acoplamiento con un gran número de moléculas diana. En el caso en el que se desee la hidrosolubilidad del marcador, la adición directa de grupos tales como NO<sub>2</sub> y SO<sub>3</sub><sup>-</sup> en los ciclos aromáticos corrige este problema pero afecta a los espectros de absorción y fluorescencia del colorante inicial.

Una tercera categoría de marcadores, tales como los descritos en los documentos EP 1 209 205, WO02/32466, WO94/08631 y Lobnik, A. *et al.* "pH optical sensors based on sol-gels. Chemical doping versus covalent immobilization" *Analytica Chimica Acta*, vol. 367, n.º 1-3, 1998, páginas 159-165, se define por el hecho de que su función química reactiva está conectada indirectamente a través de una cadena alquilo o amidoalquilo a un átomo de carbono y no a un átomo de nitrógeno, de la estructura cíclica del colorante, lo que impide la supresión de una de las cadenas sulfoalquilo o alquilo que condicionan la solubilidad del marcador.

Sin embargo, la fabricación de marcadores de esta tercera categoría da acceso a un número de entidades incluso más limitadas que las de la segunda categoría, ya que tienen el principal inconveniente de ser difíciles de sintetizar. De hecho, los precursores sintéticos de tales marcadores no están comúnmente disponibles comercialmente y su síntesis requiere la implementación de muchas etapas con bajos rendimientos finales.

Hasta la fecha, se conoce la síntesis de colorantes funcionalizados que sirven como marcadores para detectar y o cuantificar las moléculas diana. Sin embargo, los marcadores de la técnica anterior tienen al menos una de las tres

desventajas fundamentales que limitan en gran medida su uso:

- 5 - la función química reactiva de estos marcadores está cerca de un anillo del colorante, lo que causa un impedimento estérico y dificulta enormemente el acoplamiento a las moléculas diana, haciéndolas de poca utilidad. Además, sus propiedades espectrales son diferentes de las de los colorantes a partir de los cuales se obtienen, debido a los efectos electrónicos que se producen entre la función química reactiva y los ciclos aromáticos del colorante.
- 10 - Estos marcadores son escasamente solubles en el medio de acoplamiento cuya naturaleza está dictada por la identidad de la molécula diana.
- 10 - Estos marcadores no se sintetizan a partir de reactivos fácilmente disponibles en el mercado y de acuerdo con los procesos de síntesis sencillos y rápidos; en consecuencia, el número disponible de estos marcadores es limitado.

15 La presente invención propone, en principio, prepararse de acuerdo con un procedimiento particular de los marcadores de una cuarta categoría que no presentan ninguno de los inconvenientes de los marcadores de la técnica anterior.

20 Además, con el conocimiento del solicitante, nunca se ha descrito, en la técnica anterior, un procedimiento que permita funcionalizar con facilidad una variedad muy amplia de colorantes. De hecho, los procedimientos de la técnica anterior sólo se pueden aplicar a un número limitado de colorantes, pese a que existen un gran número de colorantes con características espectrales específicas que presentan un interés para el marcado de moléculas diana.

25 Además, durante los multi-marcados, es esencial tener en cuenta los posibles problemas de superposición parcial de espectros de emisión de los marcadores usados que distorsionan la lectura de los resultados. En el contexto de la presente invención, este problema de recuperación se reduce al mínimo en la medida en que el usuario dispone de una gran variedad de marcadores, opcionalmente fluorescentes que tienen propiedades espectrales diferentes, es decir, longitudes de onda excitación y de emisión diferentes que cubren una amplia región del espectro de detección.

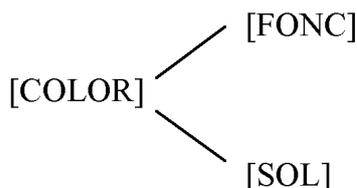
30 El interés del procedimiento de la invención es permitir seleccionar un colorante en función de sus características espectrales particulares y poder funcionalizarlo fácilmente sin alterar significativamente sus características espectrales ni sus características de solubilidad.

35 En vista de la técnica anterior, es evidente que existe una necesidad para una amplia variedad de marcadores fáciles de sintetizar a partir de colorantes cuya elección viene dictada principalmente por sus propiedades de absorción y emisión, dichos marcadores tienen no sólo sustancialmente las mismas propiedades espectrales que los colorantes a partir de los cuales se obtienen, sino también una solubilidad en el medio de acoplamiento que es equivalente o incluso mejorado con respecto al colorante inicial.

40 Los inventores, como consecuencia de un intenso trabajo de investigación, han tenido el mérito de descubrir que era posible obtener una amplia variedad de nuevos marcadores que agrupan todas las características funcionales y espectrales buscadas a partir de una amplia variedad de colorantes o productos intermedios actualmente disponibles comercialmente.

45 La presente invención es como se describe en el conjunto de reivindicaciones anexas. También se describe nuevos marcadores capaces de formar un enlace covalente o no covalente con una molécula diana, que consiste en un colorante unido covalentemente por uno o más carbonos de su estructura química a:

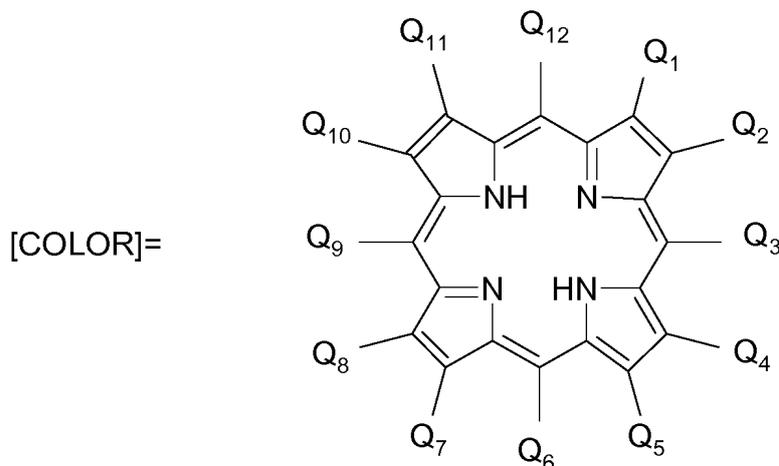
50 uno o más grupos [FONC], y  
opcionalmente uno o más grupos [SOL],  
dicho marcador presenta la fórmula general:



55 [COLOR] representa una molécula seleccionada entre el grupo que comprende ftaleínas, carbocianinas, merocianinas, porfirinas, ftalocianinas;  
[FONC] representa cada uno independientemente un grupo -X-A-Z, en el que:

- 60 - X se selecciona entre el grupo que consiste en un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo lineal o

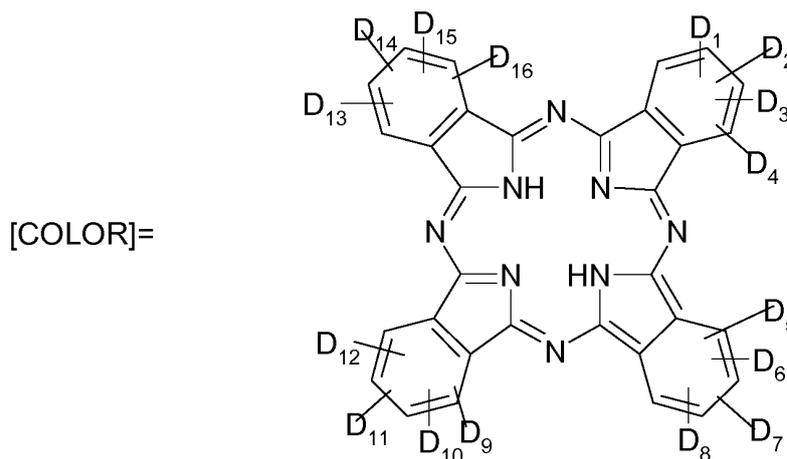




(4)

por "ftalocianinas" se entiende los colorantes que presentan la siguiente estructura (5):

5



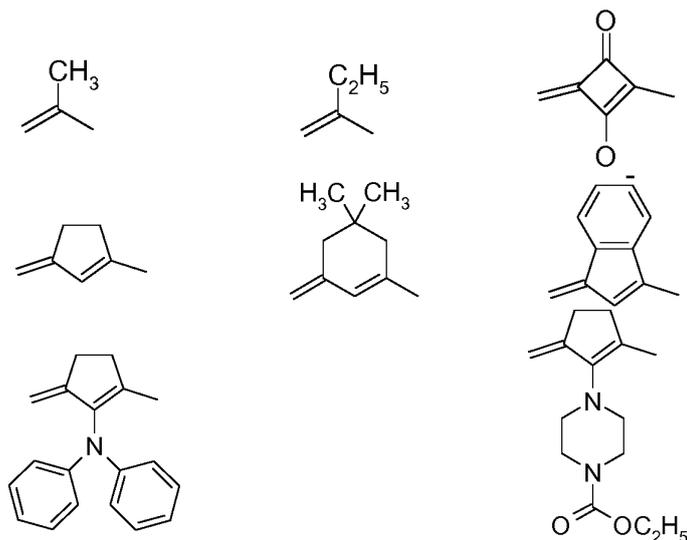
(5)

en los cuales:

- 10 - M<sub>1</sub> a M<sub>4</sub>, M<sub>9</sub> a M<sub>12</sub>, Q<sub>1</sub> a Q<sub>12</sub>, D<sub>1</sub> a D<sub>16</sub>, que son idénticos o diferentes entre sí, se seleccionan entre el grupo que comprende los siguientes radicales o grupos: hidrógeno, hidroxilo, halógeno, acetilo, amina, amina sustituida, amonio cuaternario, fosfato, nitro, ácido carboxílico y sus sales, ácido sulfónico y sus sales, alquilcarboxi de 2 a 30 átomos de carbono, alquilo, lineal o ramificado, que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, cicloalquilo que tiene de 3 a 14 átomos de carbono, alquiloxi que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, halogenalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, hidroxialquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, alquiléster que tiene de 2 a 40 átomos de carbono, nitroalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, carboxialquilo que tiene de 2 a 30 átomos de carbono, aminoalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, sulfoalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, arilo, ariloxi, arilalquilo, halogenarilo, ariléster,
- 15
- 20 Q<sub>3</sub>, Q<sub>6</sub>, Q<sub>9</sub> y Q<sub>12</sub> no pueden representar arilo o ariloxi, con la condición de que al menos uno de Q<sub>1</sub> a Q<sub>12</sub> representa H o un ciclo aromático, con la condición de que al menos uno de D<sub>1</sub> a D<sub>16</sub> representa H;
- 25 - Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan cada uno, independientemente uno de otro, los átomos necesarios para completar un núcleo indol, bencindol o naftindol;
- Z<sub>3</sub> representa O o S;

- V y W son cada uno, independientemente uno de otro, seleccionados entre CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>, O, S, Se y NR<sub>9</sub>, en el que R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> son cada uno, independientemente los unos de los otros, seleccionados entre hidrógeno y un grupo (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>R<sub>10</sub>, o m es un número entero de 1 a 18 y R<sub>10</sub> se selecciona entre hidrógeno, amina, amina sustituida, amonio cuaternario, aldehído, halógeno, ciano, arilo, heteroarilo, hidroxilo, amida, ácido sulfónico y sus sales, ácido carboxílico y sus sales;
- n es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 7 y más preferentemente de 1 a 3;
- i es un número entero de 1 a n;
- R<sub>3</sub> a R<sub>6</sub> representan cada uno, independientemente los unos de los otros, un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, más preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, cicloalquilo, arilo, ariloxi, nitroalquilo, alquilamina, alquilamina sustituida, alquilamonio cuaternario, alquifosfato, ácido alquilsulfónico y sus sales;
- T<sub>1</sub> a T<sub>8</sub> representan cada uno, independientemente los unos de los otros, un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, más preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, sulfoalquilo, cicloalquilo, arilo, ariloxi, nitro, amina, amina sustituida, amonio cuaternario, fosfato, ácido sulfónico y sus sales, OR<sub>11</sub> con R<sub>11</sub> seleccionado entre hidrógeno y un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, más preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, COOR<sub>11</sub> o CONHR<sub>11</sub> con R<sub>11</sub> como se ha definido previamente;
- G<sub>1i</sub>, G<sub>2i</sub> y G<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> a M<sub>8</sub> representan cada uno, independientemente los unos de los otros, un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, más preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, cicloalquilo, arilo;
- B<sub>1i</sub>, B<sub>2i</sub>, B<sub>3</sub> representan cada uno, independientemente los unos de los otros, un grupo metina (=CH-), cicloalquilo mono o di-insaturado de 4 a 8 átomos de carbono, aril-cicloalquilo mono o di-insaturado de 4 a 8 átomos de carbono o uno de los siguientes grupos:

25



30

cada uno de estos grupos es no sustituido, sustituido con uno o más de los siguientes grupos: alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, halógeno, sulfonato, sulfoalquilo, arilo, sulfoarilo, ariloxi, hidroxilo, hidroxilato, cetona, nitro, amina, amina sustituida, amonio cuaternario;

35

- Y representa un contraión seleccionado entre los siguientes iones: haluro, p-toluensulfonato, metansulfonato, trifluorometan-sulfonato, perclorato, acetato, sodio, potasio, calcio, magnesio, litio, amonio y trialquilamonio;
- p es un número entero de 0 a 8 necesario para la neutralidad de la molécula.

40

Por la expresión "función química reactiva", se designa cualquier grupo funcional capaz de unirse de forma covalente o no covalente (electrostática, hidrógena, coordinativa, iónica o complejo) directamente o tras la activación, con al menos una de las funciones naturalmente presentes o artificialmente introducidas en una molécula diana. A modo de ejemplos no limitativos de funciones químicas reactivas apropiadas para los fines de la invención, se puede mencionar especialmente las funciones ácido carboxílico y sus sales, ácido sulfónico y sus sales, anhídrido de ácido, cloruro de ácido, éster (éster alquílico, éster de p-nitrofenilo, éster de succinimidilo, éster de sulfosuccinimidilo, etc ...), azido (azida de acilo, azidonitrofenilo, etc ...), hidrazida, 3-acil-1,3-tiazolidina-2-tiona, amina, amina sustituida, amonio cuaternario, isocianato, isotiocianato, hidracina, ftalimido, maleimida, haloacetamida, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina mono o dihalogenada, diazina mono o dihalogenada, aziridina, tiol, cloruro de sulfonilo, vinilsulfona, disulfuro, metantiosulfonato, hidroxilo, fosforamidita, epoxi, aldehído, carbonato, glixal, imidazolilo.

45

Por la expresión "grupo polar o apolar", se designa cualquier grupo funcional capaz de facilitar la solubilización de un compuesto químico en los disolventes polares o apolares. A modo de ejemplos no limitativos de grupos polares, se puede citar especialmente los grupos ácido carboxílico y sus sales, ácido sulfónico y sus sales, amina, amina

5 sustituida, amonio cuaternario, carbohidrato, glicol, hidroxilo, nitro, fosfato. A modo de ejemplos no limitativos de grupos apolares, se puede citar especialmente los grupos alquilo lineal o ramificado que tienen de 1 a 30 átomos de carbono, arilo, cicloalquilo que tiene de 3 a 14 átomos de carbono, alquiloxi que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, halogenalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, hidroxialquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, alquiléster que tiene de 2 a 40 átomos de carbono, ariloxi, arilalquilo, arilalquilo sustituido, halogenarilo.

10 Por "alquileno", se designa una cadena hidrocarbonada, cíclica, lineal o ramificada, que presenta dos enlaces libres, que contienen de 1 a 30 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 18 átomos de carbono y aún más preferentemente de 1 a 5 átomos de carbono y que puede ser especialmente una cadena metileno, etileno, propileno, 2-metilpropileno, n-butileno, i-pentileno, n-pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, o un grupo ciclopentadieno.

15 Por "arileno", se designa un grupo aromático, que presenta dos enlaces libres, que contienen uno o más ciclos aromáticos, opcionalmente sustituido, incluyendo específicamente un fenileno que puede estar sustituido o no sustituido.

20 Por "alquilo" y "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>" se designa una cadena hidrocarbonada, cíclica, lineal o ramificada, que presenta un enlace libre, que contiene de 1 a 30 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 18 átomos de carbono y aún más preferentemente de 1 a 5 átomos de carbono y que puede ser específicamente una cadena metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, 1-metilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2-metilpentilo, 2,2-dimetilpropilo, isopentilo, neopentilo, 2-pentilo, hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 3-metilpentilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, dodecilo.

25 Por "molécula diana", se designa a una molécula biológica o no biológica destinada a ser acoplada a un marcador. Esta expresión incluye, entre otros, moléculas orgánicas, polímeros, materiales silicatos, naturales o sintéticos, vesículas lipídicas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, oligonucleótidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, oligosacáridos, polisacáridos, anticuerpos, antígenos, receptores celulares, haptenos, pectinas, citoquinas, hormonas, toxinas, bacterias, virus, células eucariotas.

30 El marcador de acuerdo con la invención se caracteriza por el hecho de que cada uno de los grupos [FONC] o los grupos [SOL] está fijado a un carbono de la estructura química del colorante a través de su grupo respectivo X o X' tales como los definidos en la reivindicación 1. Como resultado, los grupos hidrófilos o hidrófobos inicialmente presentes en el colorante y que pueden ser transportados por los átomos de nitrógeno o por cualquier otro átomo de la estructura, no se modifican.

35 Los ejemplos particulares pero no limitativos de grupo [FONC] se dan a continuación (Su representa el grupo succinimidilo):

40 -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOSu, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOSuSO<sub>3</sub>Na, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOH, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub>H, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub>Na, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>, -X-(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)<sub>r</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOSu, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NHCOCH<sub>2</sub>I, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NCS, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-COOSu, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub>H, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-OP[N(iPr)<sub>2</sub>][CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN], X es como se ha definido previamente, r es un número entero de 1 a 18, preferentemente 2 a 10, y más preferentemente 3 a 5.

45 Generalmente, las condiciones de reacción de acoplamiento entre un marcador y una molécula diana son dictadas por la naturaleza de la molécula diana. En el caso del marcado de ciertas moléculas biológicas frágiles, específicamente proteínas, es preferible que la reacción de acoplamiento se lleve a cabo en una solución acuosa para evitar la desnaturalización de las mismas. A tal fin, es interesante que el marcador sea dotado con uno o varios grupos Z' que le confieran un carácter hidrosoluble en el medio de acoplamiento no desnaturalizante para la proteína. En cambio, para otras moléculas diana de los grupos hidrófobos o no polares son preferentes. En este caso, el marcador debe poseer preferentemente al menos un grupo Z' que le confiera un carácter hidrófobo o no polar.

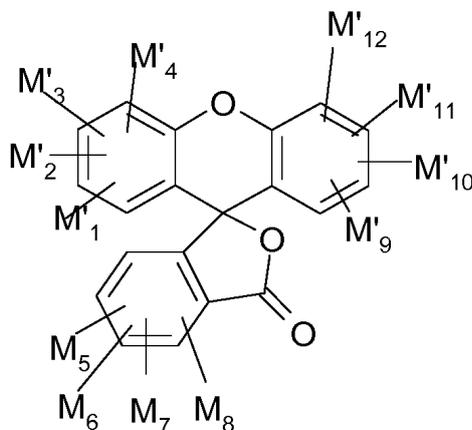
50 Estos grupos hidrófilos o lipófilos (Z') pueden estar opcionalmente introducidos de la misma forma que la función química reactiva Z. Se dan a continuación ejemplos particulares pero no limitativos de grupo [SOL] que constan de un grupo Z', hidrófilo o lipófilo, que ilustran esta analogía estructural:

55 - X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub>Na, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub>H, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-CH<sub>3</sub>, X es como se ha definido previamente, r es un número entero de 1 a 18, preferentemente de 2 a 10, y más preferentemente de 3 a 5.

60 Los marcadores de la invención pueden ser fluorescentes, cuando se realizan a partir de colorantes fluorescentes, y presentar características espectrales fluorescentes que pueden ir del ultravioleta al infrarrojo.

65 De este modo, se describe marcadores derivados de colorantes seleccionados entre el grupo que comprende los siguientes colorantes: ftaleínas, carbocianinas, merocianinas, porfirinas, ftalocianinas de dichos colorantes son como se han definido previamente.

Un marcador obtenido a partir de una ftaleína es un compuesto que presenta la estructura (6),



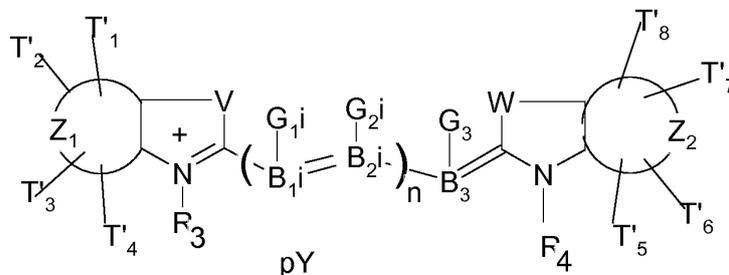
(6)

5 en la que:

cada uno de M<sub>5</sub> a M<sub>8</sub> es como se ha definido previamente;  
 cada uno de M<sub>1</sub> a M<sub>4</sub> y M<sub>9</sub> a M<sub>12</sub>, independientemente el uno del otro, puede tener la definición dada previamente para M<sub>1</sub> a M<sub>4</sub> y M<sub>9</sub> a M<sub>12</sub>, o puede representar [SOL] o [FONC], [SOL] y [FONC] como se ha definido previamente, y con la condición de que al menos uno de M<sub>1</sub> a M<sub>4</sub> y M<sub>9</sub> a M<sub>12</sub> representa [FONC].

De acuerdo con un modo de realización particular del marcador de estructura (6), al menos uno de M'<sub>1</sub>, M'<sub>2</sub>, M'<sub>3</sub> o M'<sub>4</sub> representa [FONC], y/o al menos uno de M'<sub>9</sub>, M'<sub>10</sub>, M'<sub>11</sub> o M'<sub>12</sub> representa [FONC].

El marcador de acuerdo con la invención de tipo carbocianina es como se describe en la reivindicación 1. También se describe un compuesto que presenta la siguiente estructura (7)



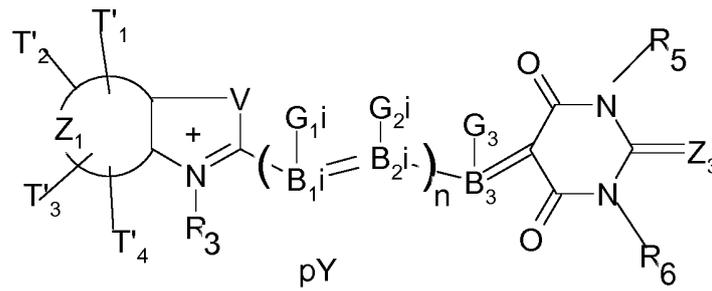
(7)

20 en la que

Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, B<sub>1i</sub>, B<sub>2i</sub>, B<sub>3</sub>, G<sub>1i</sub>, G<sub>2i</sub>, G<sub>3</sub>, V, W, Y, i, n, y p son como se han definido previamente, cada uno de T'<sub>1</sub> a T'<sub>8</sub>, independientemente uno del otro, puede tener la definición dada previamente para T'<sub>1</sub> a T'<sub>8</sub>, o puede representar [SOL] o [FONC], [SOL] y [FONC] como se ha definido previamente, y con la condición de que al menos uno de T'<sub>1</sub> a T'<sub>8</sub> representa [FONC].

De acuerdo con un modo de realización particular del marcador de estructura (7), al menos uno de T'<sub>1</sub> a T'<sub>4</sub> y/o al menos uno de T'<sub>5</sub> a T'<sub>8</sub> representa [FONC].

El marcador de tipo merocianina es un compuesto que presenta la siguiente estructura (8):

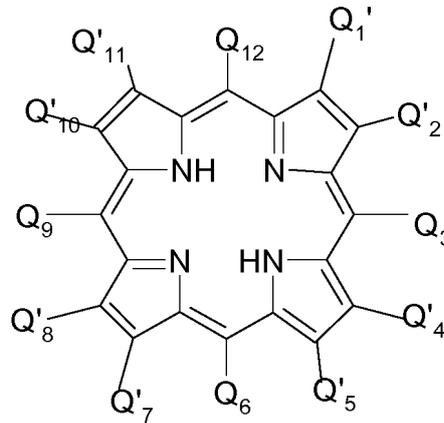


(8)

en la que

5  $Z_1, Z_3, R_3, R_5, R_6, G_{1i}, G_{2i}$  y  $G_3, B_{1i}, B_{2i}, B_3, V, Y, i, n$  y  $p$  son como se han definido previamente, cada uno de  $T'_1$  a  $T'_4$ , independientemente uno de otro, puede tener la definición dada previamente para  $T_1$  a  $T_4$ , o puede representar [SOL] o [FONC], [SOL] y [FONC] como se han definido previamente, y con la condición de que al menos uno de  $T'_1$  a  $T'_4$  representa [FONC].

10 El marcador de tipo porfirina es un compuesto que presenta la siguiente estructura (9):



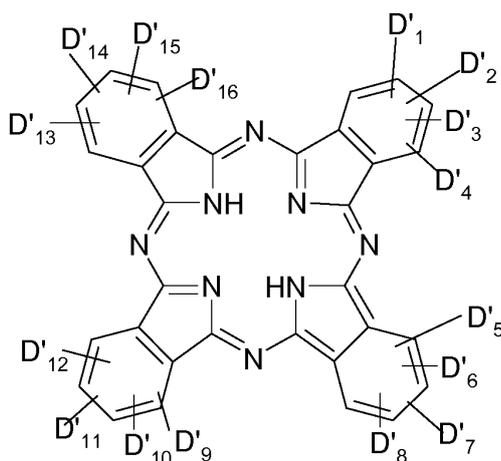
(9)

en la que

15  $Q_3, Q_6, Q_9$  y  $Q_{12}$  son como se han definido previamente, cada uno de  $Q'_1, Q'_2, Q'_4, Q'_5, Q'_7, Q'_8, Q'_{10}$  y  $Q'_{11}$ , independientemente uno del otro, puede tener la definición dada previamente para  $Q_1, Q_2, Q_4, Q_5, Q_7, Q_8, Q_{10}$  y  $Q_{11}$  o puede representar [SOL] o [FONC], [SOL] y [FONC] como se han definido previamente, y con la condición de que al menos uno de  $Q'_1, Q'_2, Q'_4, Q'_5, Q'_7, Q'_8, Q'_{10}$  y  $Q'_{11}$  representa [FONC].

20

El marcador de tipo ftalocianina es un compuesto que presente la siguiente estructura (10):



(10)

en la que

- 5 cada uno de D<sub>1</sub>' a D<sub>16</sub>', independientemente uno de otro, puede tener la definición dada previamente para D<sub>1</sub> a D<sub>16</sub>, o puede representar [FONC] o [SOL], [FONC] y [SOL] como se han definido previamente, y con la condición de que al menos uno de D<sub>1</sub>' a D<sub>16</sub>' representa [FONC].

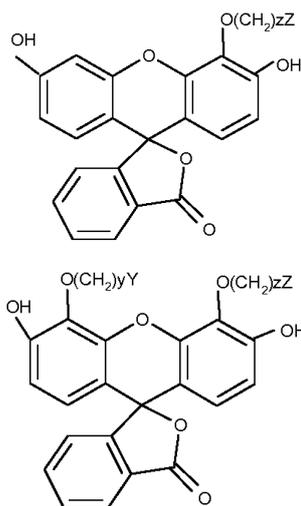
10 De acuerdo con un modo de realización de la invención, el marcador es hidrosoluble, preferentemente a una concentración superior a 0,5 % (m/v), más preferentemente a una concentración superior o igual a 2 % (m/v), e incluso aún más preferentemente superior a 10 % (m/v).

15 De acuerdo con otro modo de realización de la invención, el marcador es liposoluble, preferentemente a una concentración superior a 0,5 % (m/v), más preferentemente a una concentración superior o igual a 2 % (m/v) e incluso aún más preferentemente superior a 10 % (m/v).

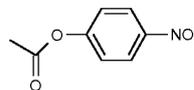
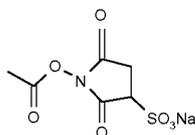
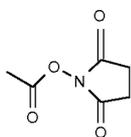
Los ejemplos específicos de los marcadores descritos previamente son los compuestos siguientes:

(1)

20



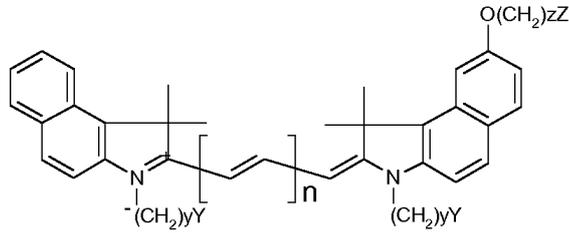
- 25 en la que cada uno de y, z, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, Z representa -COOH o



Y representa  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{SO}_3\text{Na}$

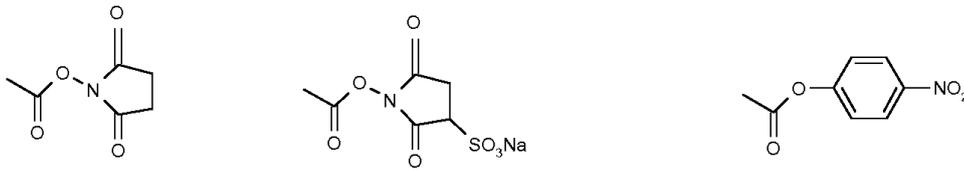
(2)

5



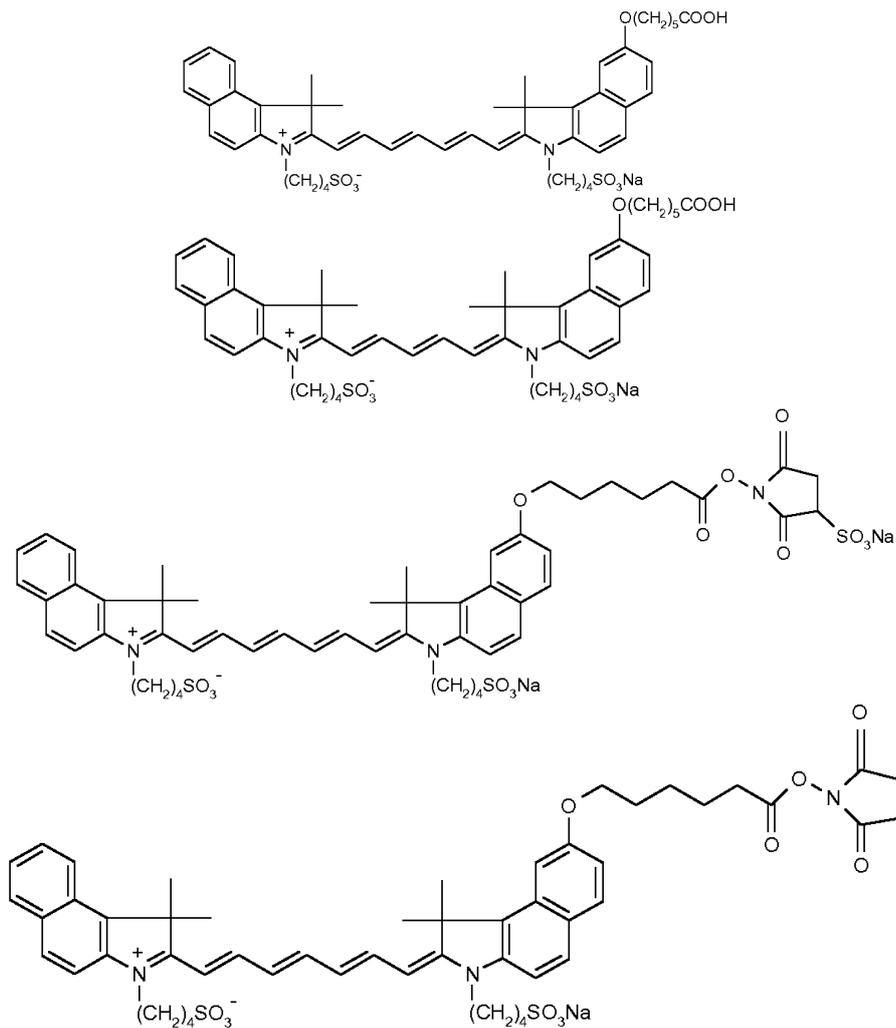
en la que cada uno de y, z y n, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, Z representa  $-\text{COOH}$  o

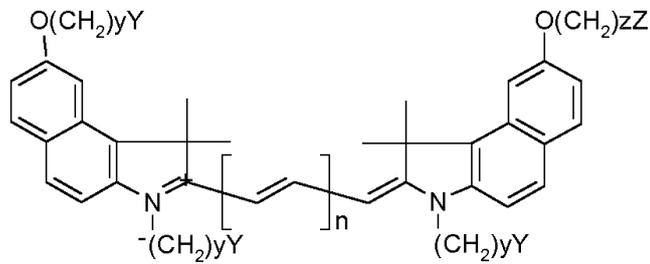
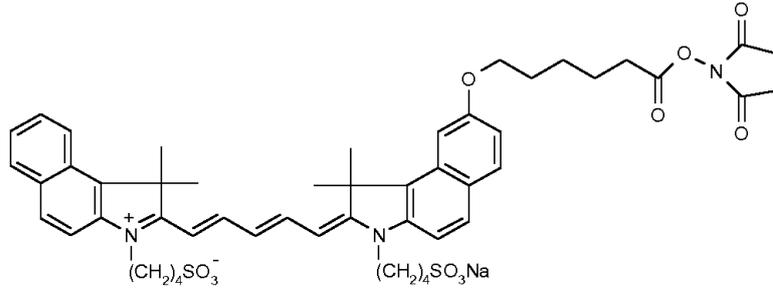
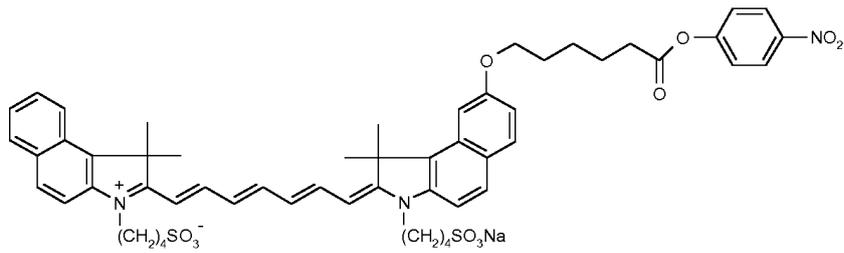
10



Y representa  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{SO}_3\text{Na}$  en particular

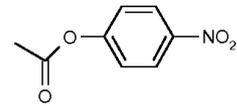
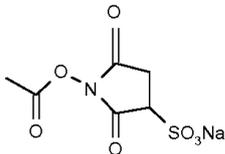
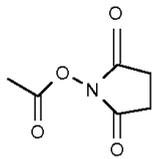
15





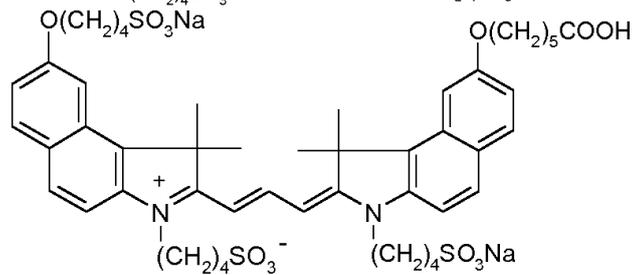
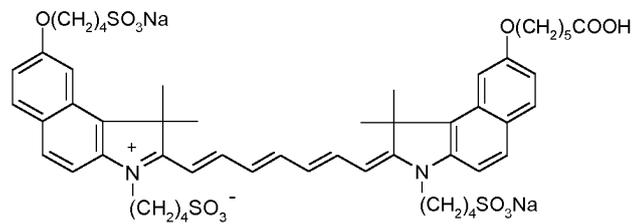
5

en la que cada uno de y, z y n, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8  
Z representa  $-\text{COOH}$  o

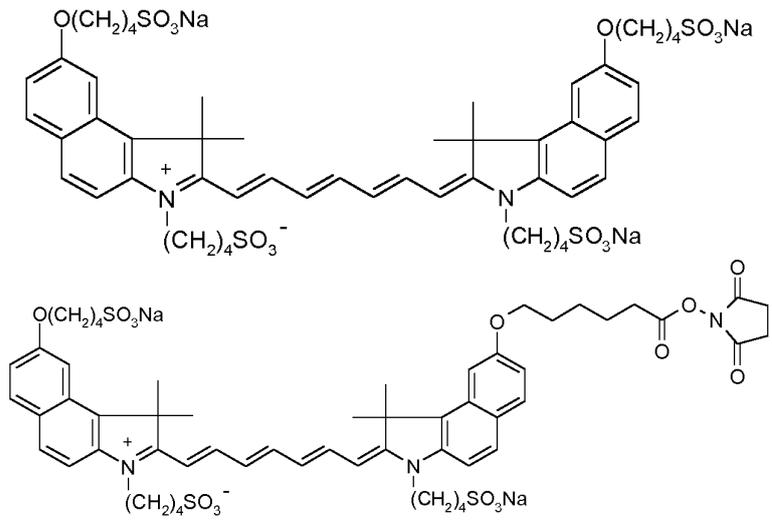


10

Y representa  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{SO}_3\text{Na}$   
en particular

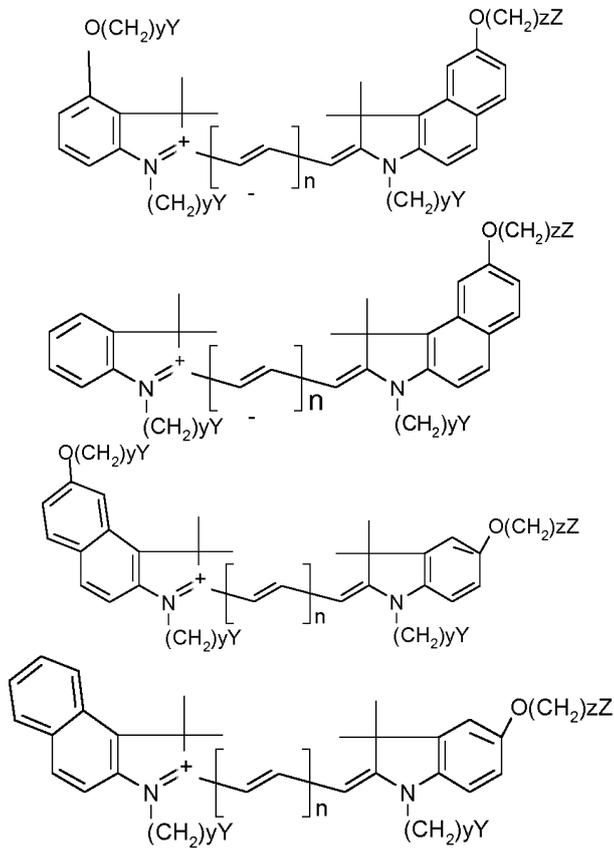


15



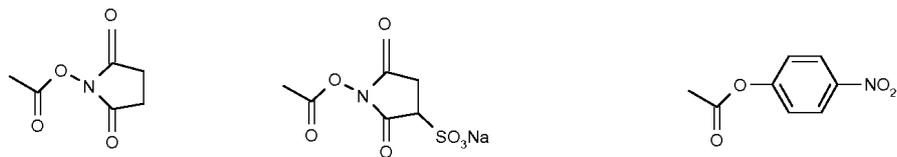
(3)

5



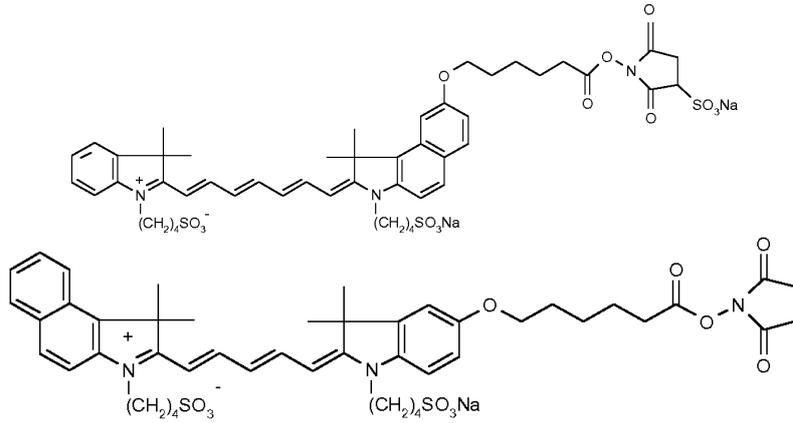
10

en las que cada uno de y, z y n, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8  
Z representa  $-\text{COOH}$  o

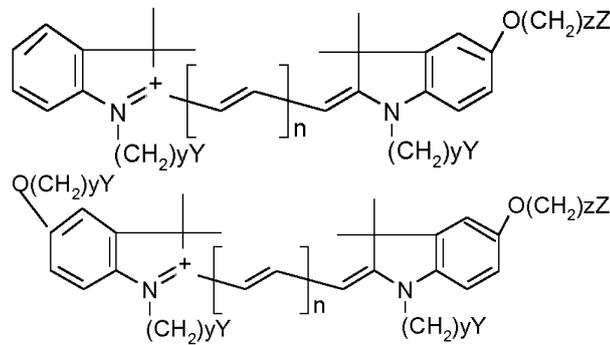


15

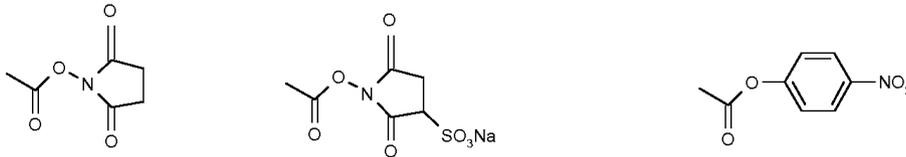
Y representa  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{SO}_3\text{Na}$   
en particular



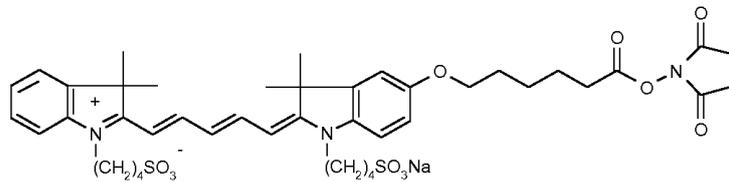
5 (5)



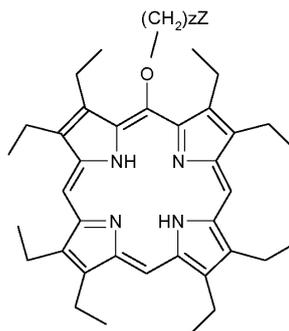
10 en las que cada uno de y, z y n, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 Z representa -COOH o

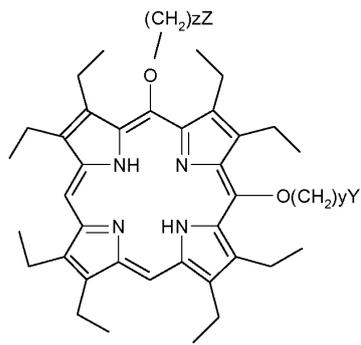


15 Y representa  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{SO}_3\text{Na}$  en particular



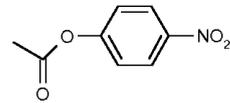
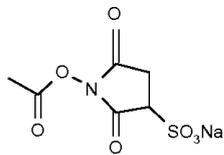
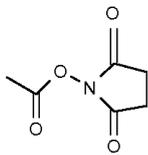
20 (6)



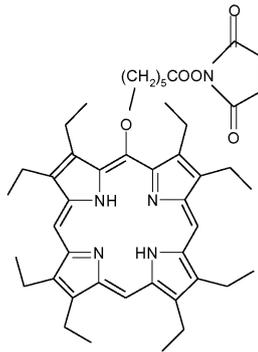


en la que cada uno de y y z, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8

5 Z representa  $-\text{COOH}$  o

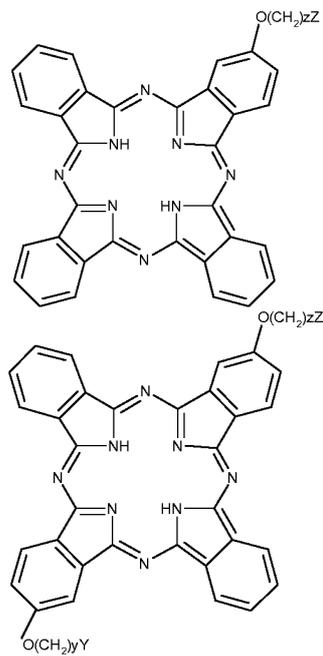


10 Y representa  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{SO}_3\text{Na}$  en particular

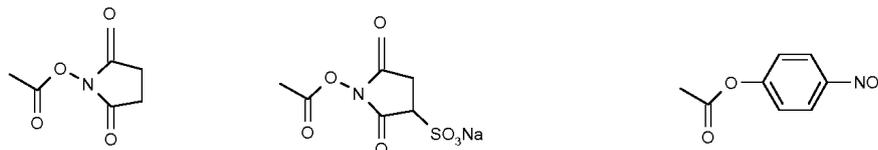


(7)

15

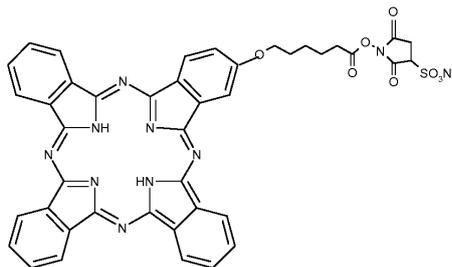


en la que cada uno de y y z, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8  
Z representa -COOH o



5

Y representa  $\text{SO}_3^-$  o  $\text{SO}_3\text{Na}$   
en particular



10

El procedimiento de preparación de marcadores de tipo carbocianina de la invención, y en particular la introducción en un átomo de carbono de la estructura del colorante, de al menos un grupo [FONC], que permite conjugar dichos marcadores a una molécula diana en un medio de acoplamiento dado y opcionalmente la introducción de al menos un grupo [SOL], constituye el segundo objeto de la invención.

15

El procedimiento de acuerdo con la invención gracias al cual fue posible sintetizar el marcador de acuerdo con la invención, se caracteriza por el hecho de que comprende una reacción de sustitución nucleófila entre:

o bien:

20

Z-A-L y [COLOR']-Nu

o bien:

25

[COLOR"]-L y Z-A-Nu

- Z y A son como se definen en la reivindicación 1;
- L representa un grupo saliente;
- Nu representa un grupo nucleófilo seleccionado entre el grupo que comprende -OH, -SH o -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, más preferentemente C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;
- [COLOR'] y [COLOR"] representa [COLOR] o un precursor o producto intermedio de síntesis de [COLOR], [COLOR] es el colorante como se define en la reivindicación 1.

30

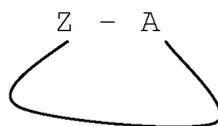
35 Por "grupo saliente", se designa un grupo que puede ser reemplazado con otro grupo durante una reacción de sustitución.

Dicho grupo saliente puede ser especialmente un halógeno o un grupo metansulfonato, p-toluensulfonato o un grupo diazonio. Este listado no es limitativo. El grupo saliente permite así pues la fijación de la cadena que transporta o bien la función química reactiva o bien la función polar o apolar, en un átomo de carbono de la estructura cíclica del colorante o de su producto intermedio de síntesis.

40

De acuerdo con un modo de realización particular, la reacción de sustitución nucleófila se puede llevar a cabo mediante la apertura de una molécula cíclica de fórmula:

45



De acuerdo con un modo de realización particular, la reacción de sustitución nucleófila puede ser una reacción de tipo Williamson, realizada entre la molécula [COLOR']-Nu y la molécula Z - A - L, en presencia de una base.

Dicha base puede ser específicamente hidróxido de sodio, carbonato de potasio, t-butilato de potasio, hidruro de sodio, amida de sodio. Este listado no es limitativo.

La invención también se refiere a procedimientos de preparación de [COLOR']-Nu y [COLOR"]-L.

5

[COLOR']-Nu se obtiene mediante las siguientes reacciones sucesivas:

1. nitración de [COLOR'];
2. reducción del producto obtenido en la etapa 1;
- 10 3. opcionalmente: o bien alquilación del producto obtenido en la etapa 2, o bien diazotación del producto obtenido en la etapa 2 para la obtención de una sal de diazonio, seguido de la sustitución nucleófila en esta función diazonio.

[COLOR"]-L es, a su vez, obtenible mediante las siguientes reacciones sucesivas:

15

- 1'. nitración de [COLOR"];
  - 2'. reducción del producto obtenido en la etapa 1';
  - 3'. diazotación del producto obtenido en la etapa 2' para la obtención de una sal de diazonio;
  - 20 4'. opcionalmente; sustitución nucleófila en la función de diazonio del producto obtenido en la etapa 3'.

De acuerdo con un modo de realización particular, [COLOR']-Nu y [COLOR"]-L representan el colorante en sí, es decir [COLOR].

25

La nitración puede llevarse a cabo por ejemplo por la acción del ácido nítrico, tetrafluoroborato de nitronio, nitrato de sodio o nitrito de sodio en medio ácido. La reducción del derivado nitrato de amina puede llevarse a cabo por hidrogenación catalítica, por transferencia de hidrógeno en presencia de un catalizador o mediante acción del cloruro de estaño en medio ácido, por ejemplo. Esta función amina puede por sí misma ser usada como grupo nucleófilo o se puede transformar en otro grupo nucleófilo. En la medida en que es preferible obtener otro grupo nucleófilo, éste puede ser fácilmente obtenido mediante la sustitución de la sal de diazonio correspondiente. En este caso, la función amina anterior se transforma en la sal de diazonio por la acción de nitrito de sodio en medio ácido. Para la obtención de una función hidroxil, la sal de diazonio se hidroliza en medio sulfúrico diluido, por ejemplo. Para la obtención de una función tiol, la sal de diazonio se hace reaccionar con un compuesto de azufre, por ejemplo un xantato, y luego se escinde.

30

35 El momento en la síntesis en que se realizan la introducción del grupo nucleófilo Nu (o del grupo saliente L), seguido de la reacción de sustitución con la molécula Z-A-L (o Z-A-Nu), es decir la elección del precursor [COLOR'] (o [COLOR"]), depende de la naturaleza del colorante usado. El experto en la materia sabrá seleccionar este momento para limitar las operaciones de protección y desprotección de grupos funcionales sensibles.

40

En el caso en el que la síntesis del colorante funcionalizado debe comenzar con uno de sus productos intermedios sintéticos que transportan el grupo nucleófilo Nu, se recomienda proteger de antemano este grupo con el fin de evitar las reacciones secundarias no deseadas.

45

Dicho grupo nucleófilo puede estar protegido por un grupo protector, por ejemplo en forma de un éter (metoxi ...) para un grupo hidroxil, un tioéter (benciltio ...) para un grupo tiol, una amida o un grupo de tipo uretano, por ejemplo, un grupo t-butoxicarbonilo o un grupo benciloxicarbonilo para una amina.

50

Tras la obtención del colorante o de uno de sus productos intermedios de síntesis, a pesar de que las últimas etapas de síntesis ya no podrían interferir con la función química reactiva, el grupo nucleófilo se desprotege bajo la acción de un ácido, una base o por reducción u oxidación y se hace reaccionar después con la molécula Z-A-L a fin de introducir la función química reactiva Z.

55

De acuerdo con un modo de realización particular, el procedimiento de la presente invención, puede conllevar la fijación de uno o más grupos [SOL] usando una o más de las etapas de reacciones químicas definidas previamente para la fijación del grupo [FONC]. En este caso, la reacción de sustitución nucleófila se realiza usando una molécula Z'-A'-L (o Z'-A'-Nu) en la que:

Z', A', Nu y L son como se han definido previamente.

60

Por lo tanto, el procedimiento puede comprender una reacción de sustitución nucleófila entre:

o bien:

Z'-A'-L y [COLOR']-Nu

65

o bien:

[COLOR']-L y Z'-A'-Nu

- Z' y A', L, Nu, [COLOR'] y [COLOR''] son como se han definido previamente;
- [COLOR']-Nu y [COLOR'']-L se preparan de acuerdo con el procedimiento descrito previamente.

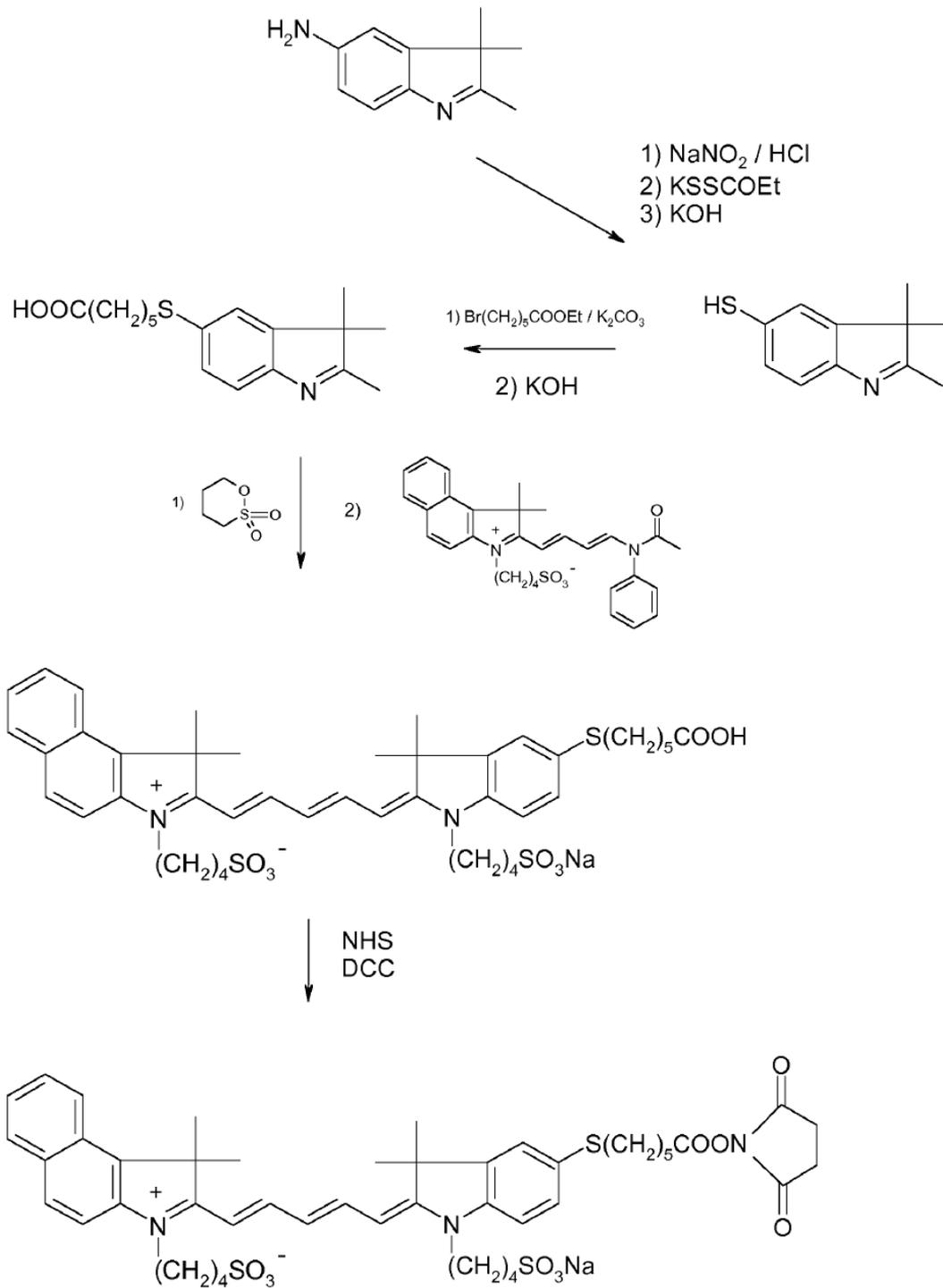
5

El procedimiento de la invención permite así obtenerse a partir de colorantes fácilmente disponibles de nuevos derivados funcionalizados cuyas características espectrales y las características de solubilidad son particularmente útiles para el marcado de moléculas diana.

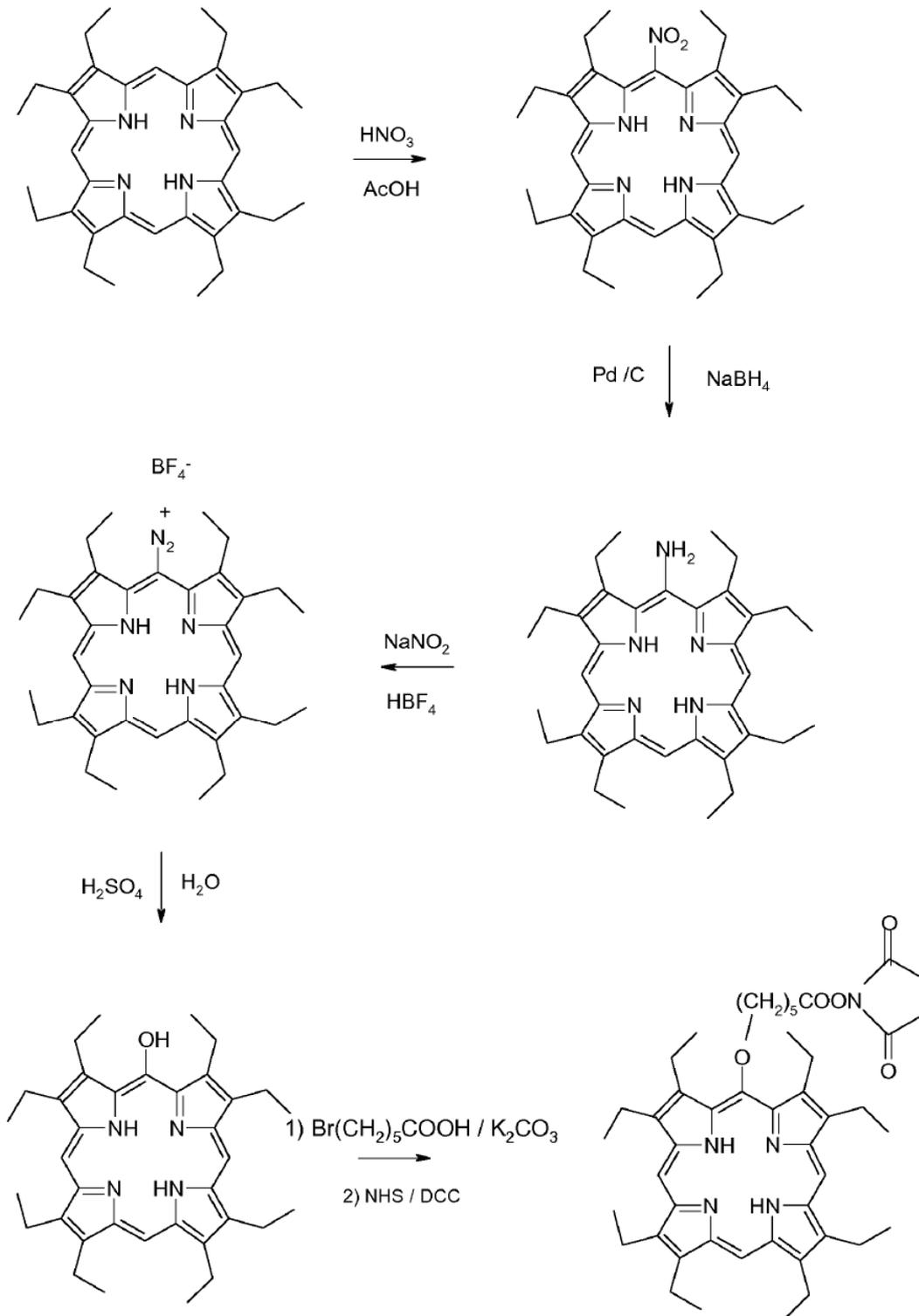
10

Los ejemplos de esquemas de reacción de preparación de marcadores a partir de carbocianinas (Esquemas Ia y Ib), ftaleínas (Esquema II) y porfirinas (Esquema III) se dan a continuación, sin limitación. En estos esquemas de reacción, NHS representa N-hidroxisuccinimida y DCC dicitohexilcarbodiimida.





(Esquema Ib)



(Esquema II)

La aplicación de los marcadores de la invención, como se han descrito previamente, para la detección y/o cuantificación de moléculas diana constituye el tercer objeto de la invención.

Como se ha indicado previamente, los marcadores de la invención son adecuados como agentes para el marcado de moléculas diana, el marcado se lleva a cabo por acoplamiento de dicho marcador de forma covalente o no covalente con la molécula diana a medir o detectar. Este acoplamiento se puede llevar a cabo de acuerdo con los procedimientos convencionales de acoplamiento usados en este campo.

De acuerdo con un modo de realización particular, la molécula diana se hace reaccionar con 1 a 200 equivalentes, más preferentemente 3 a 20 equivalentes del marcador. Cuando la molécula diana es hidrosoluble, la reacción tiene lugar en una solución acuosa tampón, preferentemente a base de fosfato, carbonato o borato, cuyo pH se comprende entre 7,0 y 11,0. Cuando la molécula diana es liposoluble, la reacción tiene lugar en un disolvente orgánico.

La reacción de acoplamiento también puede llevarse a cabo en presencia de un agente de acoplamiento peptídico, por ejemplo los reactivos de tipo carbodiimida como DCC (diciclohexilcarbodiimida), carbonildiimidazol, IDDQ (1-isobutiloxycarbonil-2-isobutiloxi-1,2-dihidroquinolina), los reactivos de tipo fosfonio como BOP (benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato), los reactivos de tipo uronio como HBTu (o-benzotriazolil-tetrametiluronio hexafluorofosfato) y TBTu (o-benzotriazoliltetrametiluronio tetrafluoroborato), los reactivos de Woodward como N-etil-5-fenilisoxazolio-3'-sulfonato, los reactivos de Curtius (hidracina y nitrito).

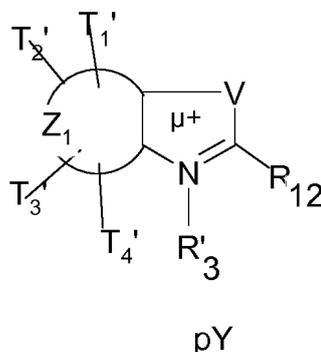
La reacción de acoplamiento se lleva a cabo si es necesario en presencia de una base orgánica y dimetilsulfóxido, o preferentemente dimetilformamida.

La molécula diana marcada se aísla del medio de reacción y se purifica por separación en gel de sílice, por permeación de gel, y/o por ultrafiltración.

La invención también se refiere a un método de detección de una molécula biológica o no biológica que comprende el acoplamiento de un marcador de acuerdo con la invención con dicha molécula, y la detección propiamente dicha de dicha molécula acoplada al marcador por espectrometría de absorción, espectrometría de fluorescencia, espectrometría de infrarrojos, electroforesis, imagen médica en el infrarrojo o infrarrojo cercano (NIRS, *Near Infra-Red Spectroscopy*) (espectroscopía infrarroja cercana). Este listado no es limitativo.

La invención también se refiere a precursores de síntesis de los marcadores de la invención, tales como se describen en la reivindicación 10.

También se describe los precursores de síntesis de marcadores que son productos nuevos que consisten en moléculas de fórmula general:



en la que

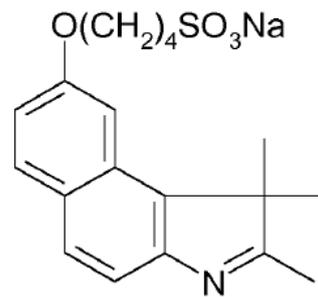
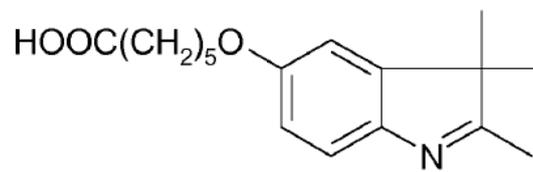
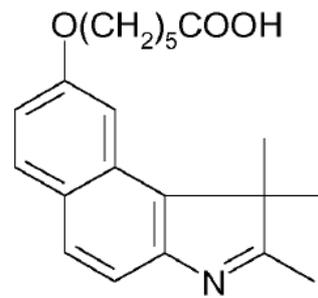
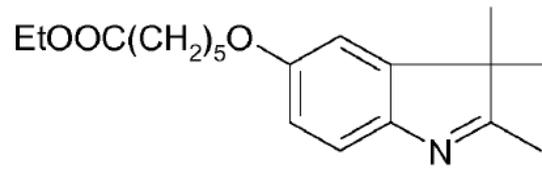
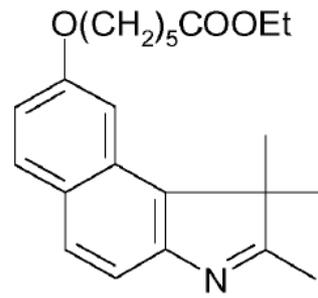
$Z_1$ ,  $V$ ,  $p$ ,  $Y$  son como se han definido previamente,

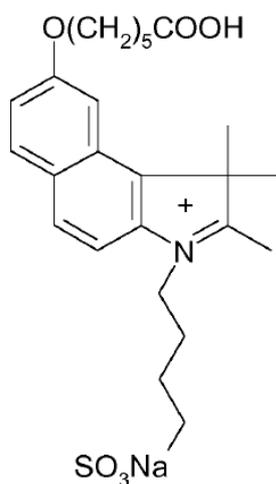
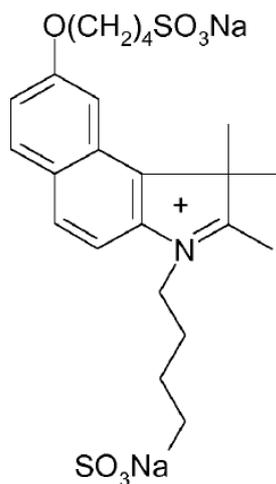
$R'_3$  representa un doblete electrónico o representa  $R_3$  tal como se ha definido previamente;

$\mu$  es un número entero igual a 0 o 1;

$R_{12}$  representa un grupo alquilo, lineal o ramificado, saturado o insaturado  $C_1$ - $C_{30}$ , preferentemente  $C_1$ - $C_{18}$ , más preferentemente  $C_1$ - $C_5$ , sulfoalquilo, cicloalquilo, arilo, ariloxi, preferentemente un grupo metilo, cada uno de  $T'_1$  a  $T'_4$ , independientemente uno de otro, puede tener la definición dada previamente para  $T_1$  a  $T_4$  o puede representar [SOL] o [FONC], [SOL] y [FONC] como se han definido previamente, y con la condición de que al menos uno de  $T'_1$  a  $T'_4$  representa [FONC].

Algunos ejemplos no limitativos de precursores se dan a continuación:





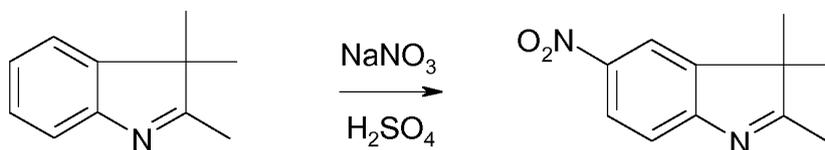
La invención se describirá con más detalle usando los siguientes ejemplos que no son limitativos, pero relativos a modos de realización ventajosos.

5

### Descripción detallada de la invención

#### Ejemplos

#### 10 EJEMPLO 1

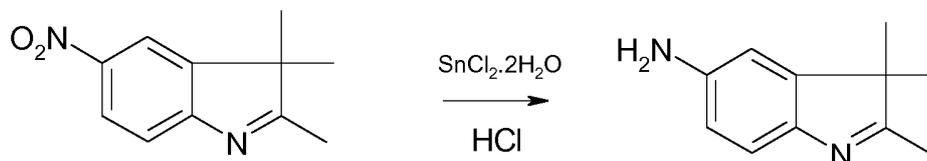


#### 15 5-nitro-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (producto A)

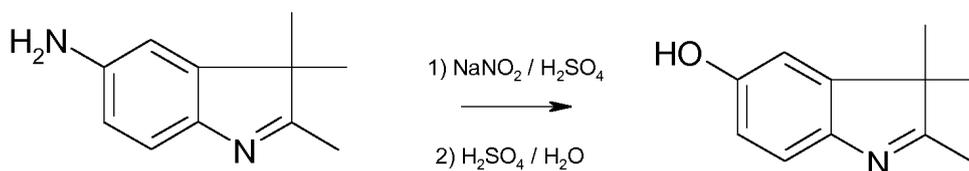
15

A una mezcla de 6,4 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol y 50 ml de ácido sulfúrico enfriado a 0-5 °C se añade, sin superar 5 °C, una solución de 3,4 g de nitrato de sodio en 100 ml de ácido sulfúrico. Tras una hora de agitación a 0-5 °C, el medio de reacción se diluye en 600 ml de agua y se neutraliza por adición de hidróxido de sodio sólido. El precipitado formado se filtra y se solubiliza en 200 ml de acetato de etilo. Tras un lavado con agua, secado sobre sulfato de magnesio y evaporación, se obtienen 8 g de producto A (Rendimiento: 97,9 %).

20

**EJEMPLO 2**5 **5-amino-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (producto B)**

Una mezcla de 6,6 g de producto A, 43,7 g de cloruro de estaño dihidrato y 215 ml de ácido clorhídrico se calienta a reflujo durante dos horas. Tras un enfriamiento a temperatura ambiente y filtración, el sólido recogido se solubiliza en 130 ml de agua. Esta solución se neutraliza mediante la adición de sosa al 20 %. El precipitado formado se filtra, posteriormente se lava con agua y se seca al vacío en presencia de anhídrido fosfórico. Se obtienen 5,4 g de producto B (Rendimiento: 96 %).

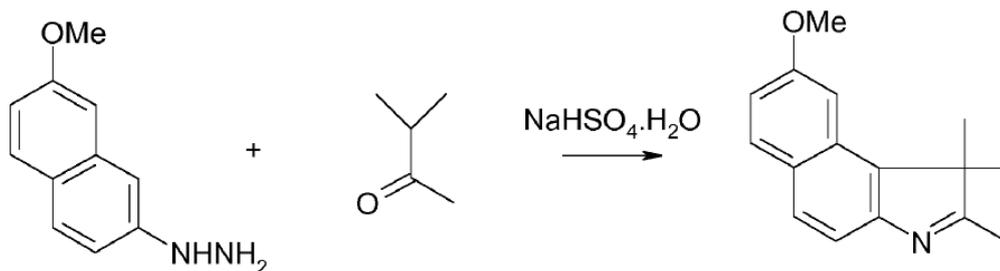
**EJEMPLO 3**

15

**5-hidroxi-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (producto C)**

Una mezcla de 3,5 g de producto B, 5 ml de ácido sulfúrico y 25 ml de agua se enfría a 0 °C. Una solución enfriada a 0-5 °C de 1,6 g de nitrito de sodio en 4 ml de agua se añade sin superar 5 °C. Tras una agitación a 0-5 °C durante 10 min, el medio de reacción se añade lentamente a una mezcla de 15 ml de ácido sulfúrico y 20 ml de agua a 90 °C. Tras una agitación a esta temperatura durante una hora seguido del enfriamiento a temperatura ambiente, el medio de reacción se neutraliza mediante la adición de sosa al 20 %. El precipitado formado se filtra, posteriormente se lava con agua y se seca al vacío en presencia de anhídrido fosfórico. Se obtienen 2,6 g de producto C (Rendimiento: 74,3 %).

25

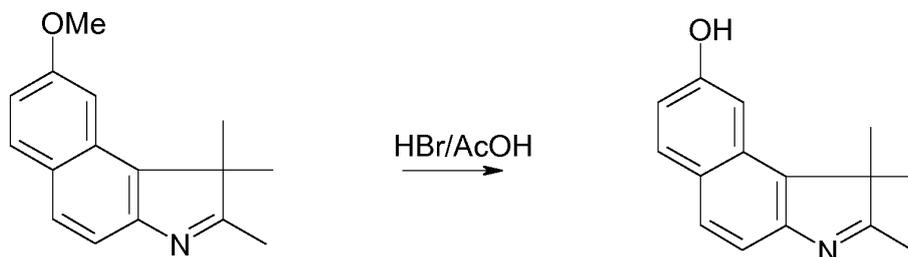
**EJEMPLO 4**

30

**5-metoxi-2,3,3-trimetil-benz(e)indol (producto D)**

Una mezcla de 35,4 g de 7-metoxi-2-naftilhidracina y 65 g de hidrogenosulfato de sodio monohidrato en 180 ml de agua se calienta a 90 °C durante 15 min, posteriormente se añaden 23 g de 3-metil-2-butanona. El medio de reacción se mantiene a 90 °C durante 7 horas, se enfría a temperatura ambiente, acto seguido se extrae con diclorometano. La fase orgánica se lava con agua y después se evapora al vacío. El residuo se purifica por cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol: 10/0,2). Se obtienen 28,9 g de producto D (Rendimiento: 64,2 %).

35

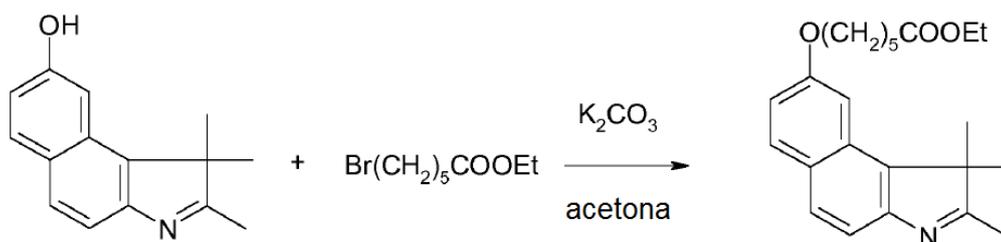
**EJEMPLO 5**5 5-hidroxi-2,3,3-trimetil-benz(e)indol (producto E)

8,2 g de producto D se introducen en un matraz de tres bocas de 250 ml. Se añaden 82 ml de HBr (33 % en ácido acético).

- 10 La mezcla se mantiene a 70 °C durante 7 horas, después se enfría a temperatura ambiente. 2,5 litros de agua seguido de 120 ml de sosa 5 M se añaden al medio de reacción. El precipitado formado se filtra, después se lava con agua y se seca al vacío en presencia de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Se obtienen 6,8 g de producto E (Rendimiento: 88,7 %).

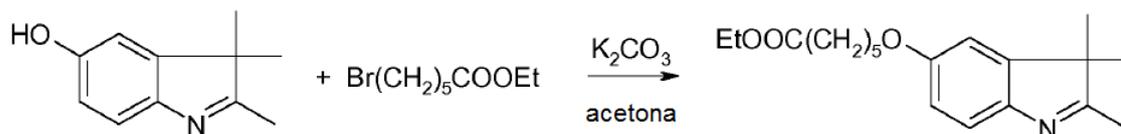
**EJEMPLO 6**

15

5-[(5-carboxipentil)oxi]-2,3,3-trimetil-benz(e)indol (producto F)

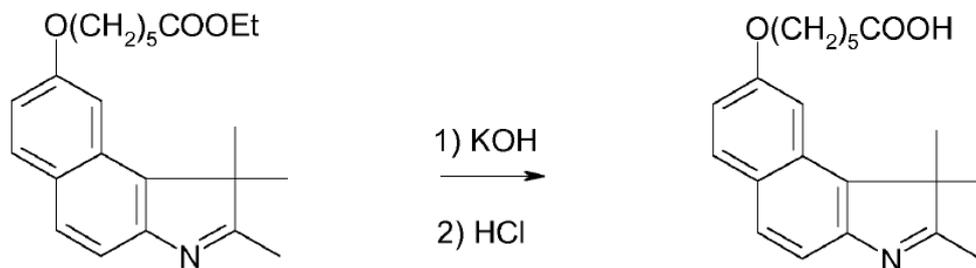
- 20 Una mezcla de 20 g de producto E, 21,7 g de 6-bromohexanoato de etilo y 13,5 g de carbonato de potasio en 120 ml de acetona se calienta a reflujo durante 8 horas, después se enfría a temperatura ambiente. El medio de reacción se filtra y después se evapora al vacío. El residuo se disuelve en 400 ml de éter etílico y se lava tres veces con agua. Tras la evaporación y eliminación del exceso de 6-bromohexanoato de etilo por destilación al vacío, se obtienen 32,5 g de producto F (Rendimiento: 100 %) en forma de un aceite marrón.

25

**EJEMPLO 7**30 5-[(5-carboxipentil)oxi]-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (producto G)

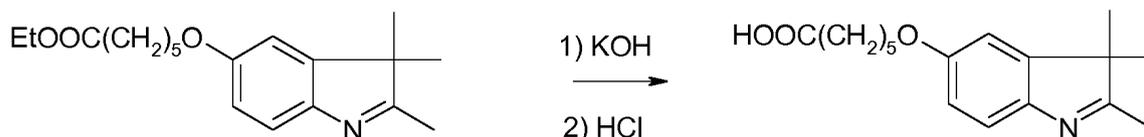
Una mezcla de 23,1 g de producto C, 32,4 g de 6-bromohexanoato de etilo y 20,1 g de carbonato de potasio en 180 ml de acetona se calienta a reflujo durante 8 horas, después se enfría a temperatura ambiente. El medio de reacción se filtra y después se evapora al vacío. El residuo se disuelve en 600 ml de éter etílico y se lava tres veces con agua. Tras la evaporación y eliminación del exceso de 6-bromohexanoato de etilo por destilación al vacío, se obtienen 41,8 g de producto G (Rendimiento: 100 %) en forma de un aceite marrón.

35

**EJEMPLO 8**5 5-[(5-carboxipentil)oxi]-2,3,3-trimetil-benz(e)indol (producto H)

11,6 g de producto F en 100 ml de KOH 1 M se calientan a 80 °C durante 30 min. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el medio de reacción se neutraliza por adición de ácido clorhídrico 1 M. El precipitado formado se filtra, después se lava con agua y se seca al vacío en presencia de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Se obtienen 9 g de producto H (Rendimiento: 84,2 %).

10

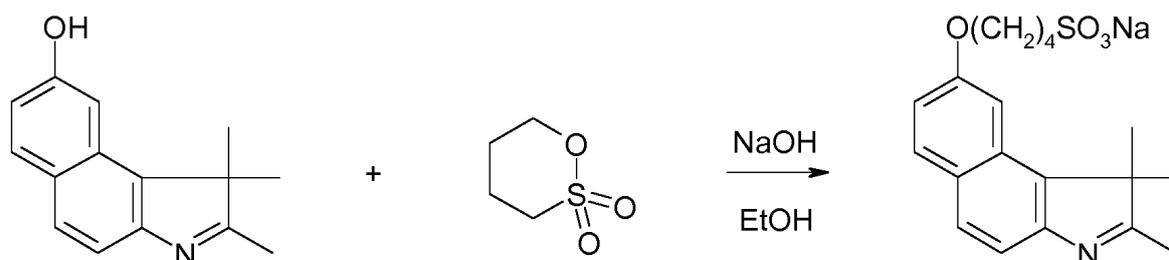
**EJEMPLO 9**

15

## 5-[(5-carboxipentil)oxi]-2,3,3-trimetil-(3H)indol (producto I)

4,2 g de producto G en 45 ml de KOH 1 M se calientan a 80 °C durante 30 min. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el medio de reacción se neutraliza por adición de ácido clorhídrico 1 M. El precipitado formado se filtra, después se lava con agua y se seca al vacío en presencia de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Se obtienen 2,5 g de producto I (Rendimiento: 66,5 %).

20

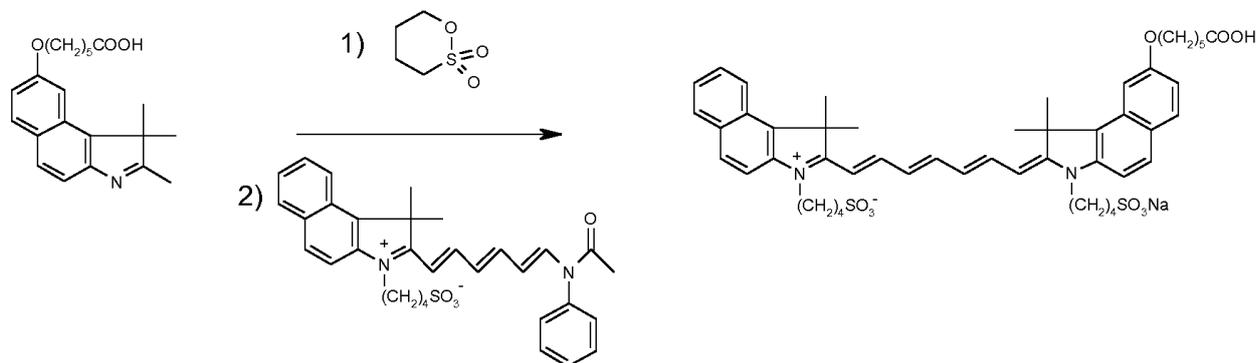
**EJEMPLO 10**

25

## 5-[(4-sulfobutil)oxi]-2,3,3-trimetil-benz(e)indol, sal de sodio (producto J)

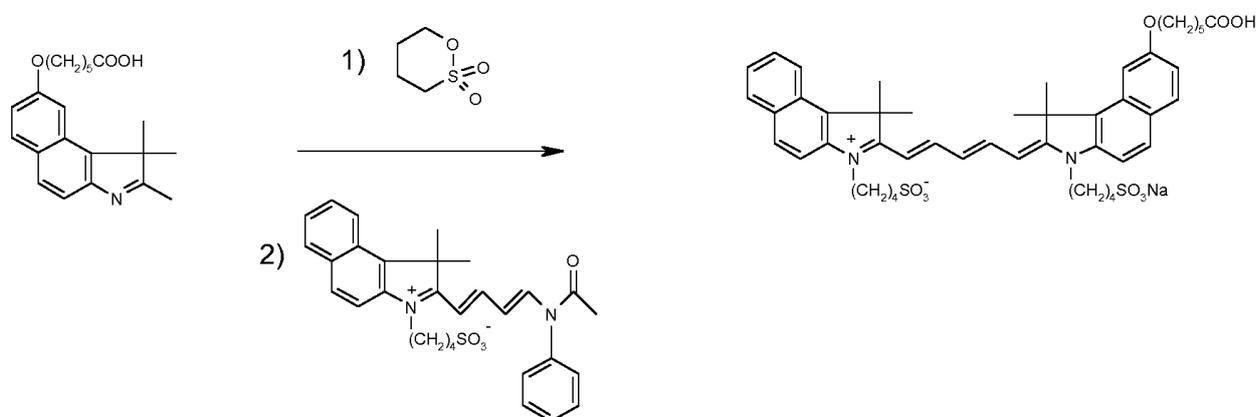
Una mezcla de 1,3 g de producto E, 0,9 g de 1,4-butano sultona y 0,3 g de hidróxido de sodio en 10 ml de etanol se calienta a reflujo durante dos horas. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, el medio de reacción se añade a 100 ml de acetona bajo agitación. El precipitado formado se filtra, después se lava con acetona y se seca al vacío. Se obtienen 1,8 g de producto J altamente higroscópico (Rendimiento: 81,2 %).

30

**EJEMPLO 11**

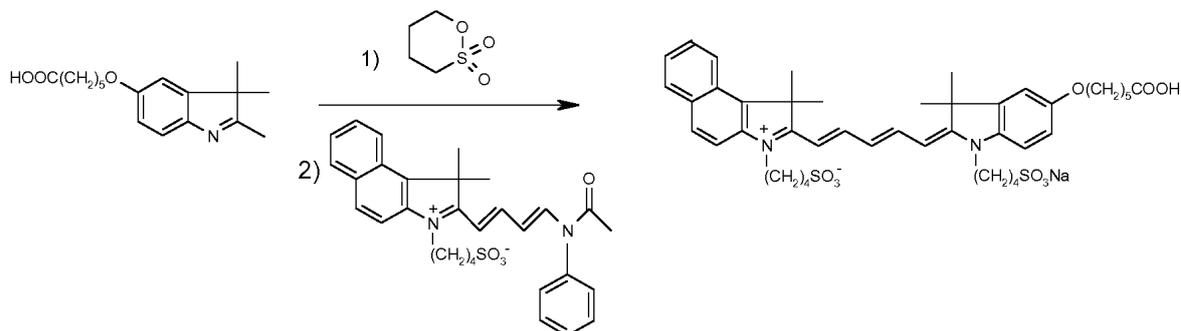
5 2-[7-[8-(5-carboxipentiloxi)-1,3-dihidro-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-benz(e)indol-2-ilideno]-1,3,5-heptatrienil]-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-1H-benz(e)indolio, sal interna, sal de sodio (producto K)

Una mezcla de 10,2 g de producto H y 32,7 g de 1,4-butano sultona se calienta a 115 °C durante 16 horas, posteriormente se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 120 ml de tolueno, acto seguido el medio se filtra para recuperar la fracción insoluble. El precipitado se enjuaga con acetona y se seca al vacío. 13,3 g de este sólido se hacen reaccionar con 15,2 g de 2-(6-acetanilido-1,3,5-hexatrienil)-3,3-dimetil-1-(4-sulfobutil)-benz(e)indolio, sal interna, en 90 ml de etanol. Se añaden gradualmente 2,9 g de trietilamina y la mezcla se calienta a reflujo durante 5 minutos, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 3,8 g de acetato de sodio trihidrato y la mezcla se agita durante 10 minutos. El precipitado formado se filtra, después se lava con acetona y se seca al vacío. Se obtienen 18,5 g de producto K (Rendimiento: 72,8 %).

**EJEMPLO 12**

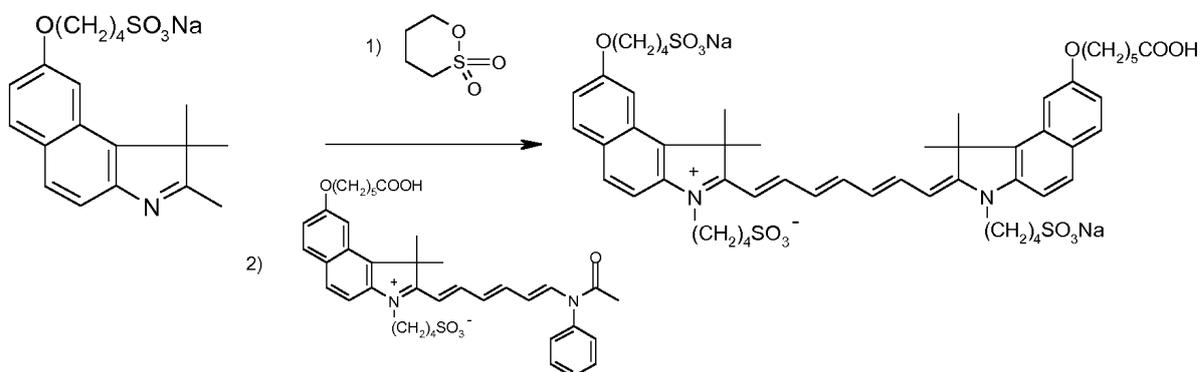
20 2-[5-[8-(5-carboxipentiloxi)-1,3-dihidro-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-benz(e)indol-2-ilideno]-1,3-pentadienil]-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-1H-benz(e)indolio sal interna, sal de sodio (producto L)

25 Una mezcla de 8,1 g de producto H y 26,2 g de 1,4-butano sultona se calienta a 120 °C durante 12 horas, posteriormente se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 80 ml de tolueno, acto seguido el medio se filtra para recuperar la fracción insoluble. El precipitado se enjuaga con acetona y se seca al vacío. 10,6 g de este sólido se hacen reaccionar con 11,5 g de 2-(4-acetanilido-1,3-butadienil)-3,3-dimetil-1-(4-sulfobutil)-benz(e)indolio, sal interna, en 75 ml de etanol. Se añaden gradualmente 2,2 g de trietilamina y la mezcla se calienta a reflujo durante 5 minutos, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 3 g de acetato de sodio trihidrato y la mezcla se agita durante 30 10 minutos. El precipitado formado se filtra, después se lava con acetona y se seca al vacío. Se obtienen 15,2 g de producto L (Rendimiento: 75,2 %).

**EJEMPLO 13**

5 2-[5-[6-(5-carboxipentiloxi)-1,3-dihidro-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-indol-2-ilideno]-1,3-pentadienil]-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-1H-benz(e)indolio, sal interna, sal de sodio (producto M)

Una mezcla de 10,8 g de producto I y 40,8 g de 1,4-butano sultona se calienta a 130 °C durante 8 horas, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 80 ml de tolueno, acto seguido el medio se filtra para recuperar la fracción insoluble. El precipitado se enjuaga con acetona y se seca al vacío. 13,4 g de este sólido se hacen reaccionar con 16,3 g de sal interna de 2-(4-acetanilido-1,3-butadienil)-3,3-dimetil-1-(4-sulfobutil)-benz(e)indolio en 175 ml de etanol. Se añaden gradualmente 3,2 g de trietilamina y la mezcla se calienta a reflujo durante 5 minutos, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 4,3 g de acetato de sodio trihidrato y la mezcla se agita durante 10 minutos. El precipitado formado se filtra, después se lava con acetona y se seca al vacío. Se obtienen 18,2 g de producto M (Rendimiento: 69,6 %).

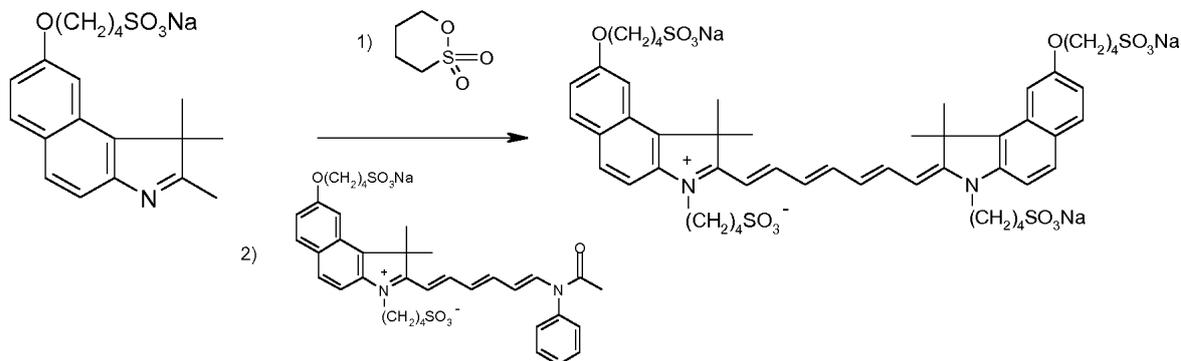
**EJEMPLO 14**

20 2-[7-[8-(5-carboxipentiloxi)-1,3-dihidro-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-benz(e)indol-2-ilideno]-1,3,5-heptatrienil]-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-8-(4-sulfobutiloxi)-1H-benz(e)indolio, sal interna, sal de sodio (producto N)

Una mezcla de 0,6 g de producto J y 1,7 g de 1,4-butano sultona se calienta a 120 °C durante 16 horas, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 5 ml de tolueno, acto seguido el medio se filtra para recuperar la fracción insoluble. El precipitado se enjuaga con acetona y se seca al vacío. 0,7 g de este sólido se hacen reaccionar con 0,9 g de 2-(6-acetanilido-1,3,5-hexatrienil)-5-(5-carboxipentiloxi)-3,3-dimetil-1-(4-sulfobutil)-benz(e)indolio, sal interna, (obtenido a partir de la sal interna de 5-(5-carboxipentiloxi)-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-benz(e)indolio, cuya preparación se describe en los ejemplos 11 y 12, y clorhidrato de dianilida de aldehído glutacónico) en 10 ml de etanol. 0,14 g de trietilamina se añaden gradualmente y la mezcla se calienta a reflujo durante 5 minutos, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 0,18 g de acetato de sodio trihidrato y la mezcla se agita durante 10 minutos. El precipitado formado se filtra, después se lava con acetona y se seca al vacío. Se obtienen 1,1 g de producto N (Rendimiento: 75,5 %).

35

**EJEMPLO 15**

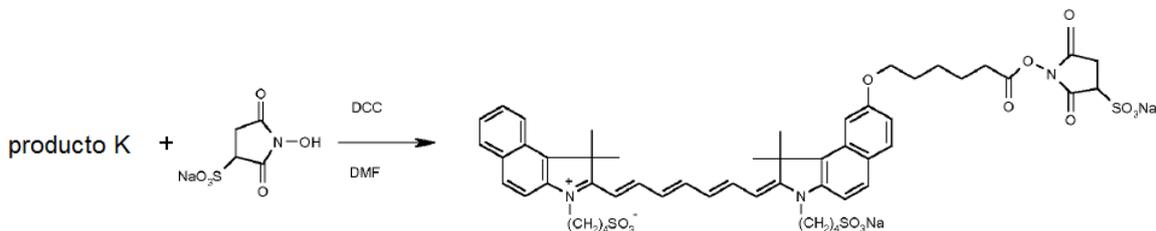


5 2-[7-[8-(4-sulfobutiloxi)-1,3-dihidro-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-benz(e)indol-2-ilideno]-1,3,5-heptatrienil]-1,1-dimetil-3-(4-sulfobutil)-8-(4-sulfobutiloxi)-1H-benz(e)indolio, sal interna, sal trisódica (producto O)

Una mezcla de 0,6 g de producto J y 1,7 g de 1,4-butano sultona se calienta a 120 °C durante 16 horas, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 5 ml de tolueno, acto seguido el medio se filtra para recuperar la fracción insoluble. El precipitado se enjuaga con acetona y se seca al vacío. 0,7 g de este sólido se hacen reaccionar con 0,97 g de 2-(6-acetanilido-1,3,5-hexatrienil)-3,3-dimetil-1-(4-sulfobutil)-5-(4-sulfobutiloxi)-benz(e)indolio, sal interna, sal de sodio, (obtenido a partir de 1-(4-sulfobutil)-5-(4-sulfobutiloxi)-2,3,3-trimetil-benz(e)indolio, sal interna, sal de sodio, cuya preparación se ha descrito previamente, y clorhidrato de dianilida de aldehído glutacónico) en 10 ml de etanol. 0,14 g de trietilamina se añaden gradualmente y la mezcla se calienta a reflujo durante 5 minutos, después se enfría a temperatura ambiente. Se añaden 0,18 g de acetato de sodio trihidrato y la mezcla se agita durante 10 minutos. El precipitado formado se filtra, después se lava con acetona y se seca al vacío. Se obtienen 1,2 g de producto O (Rendimiento: 79,1 %).

**EJEMPLO 16**

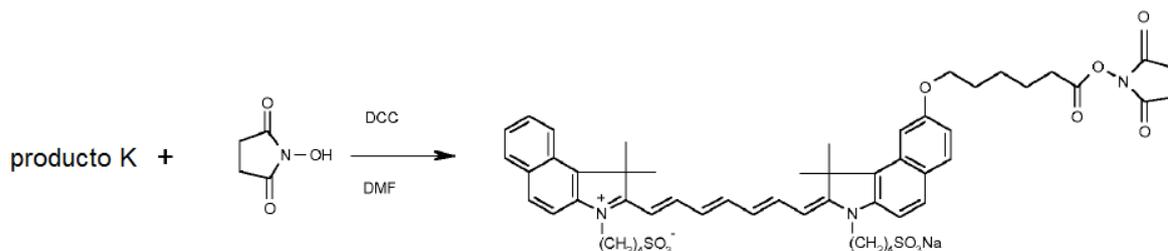
20



Sulfosuccinimidil éster del producto K (producto P)

25 0,09 g de producto K se solubilizan en 5 ml de DMF. Se añaden 0,11 g de 1-hidroxi-3-succinimida-sulfonato de sodio y 25 mg de dicitclohexilcarbodiimida. El medio de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, posteriormente se filtra. Se añaden 100 ml de éter etílico al filtrado. El precipitado formado se filtra y se seca al vacío. Se obtienen 105 mg de producto P (Rendimiento: 95,4 %).

**EJEMPLO 17**



Succinimidilo éster del producto K (producto Q)

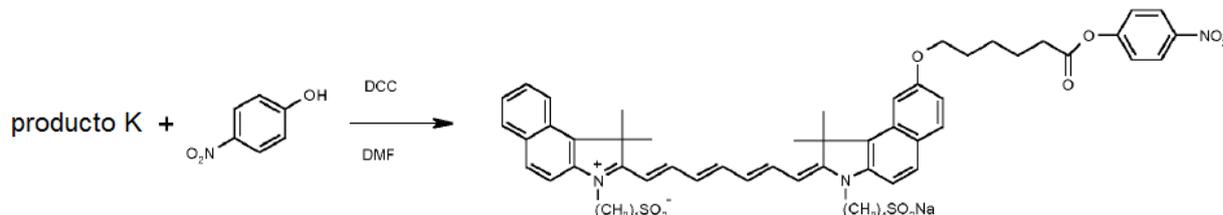
35

1,08 g de producto K se solubilizan en 50 ml de DMF. Se añaden 0,69 g de N-hidroxisuccinimida y 0,31 g de dicitclohexilcarbodiimida. El medio de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas,

después se filtra. Se añaden 250 ml de éter etílico al filtrado. El precipitado formado se filtra y se seca al vacío. Se obtienen 1,1 g de producto Q (Rendimiento: 91,7 %).

**EJEMPLO 18**

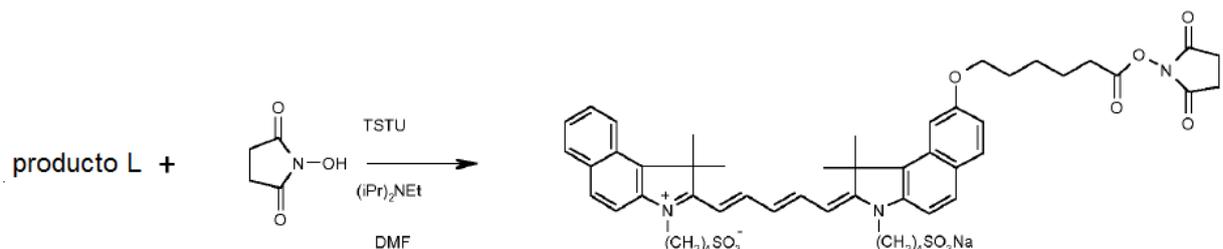
5



p-nitrofenil éster del producto K (producto R)

10 90 mg de producto K y 17 mg de p-nitrofenol se solubilizan en 2 ml de DMF. Se añaden 25 mg de dicitohexilcarbodiimida. El medio de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, después se filtra. Se añaden 100 ml de éter etílico al filtrado. Tras una filtración y secado al vacío, se obtienen 101 mg de producto R (Rendimiento: 98 %).

**EJEMPLO 19**

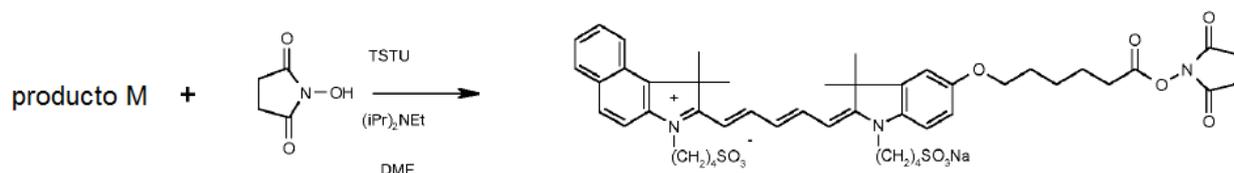


Succinimidil éster del producto L (producto S)

20 0,24 g de producto L y 0,12 g de TSTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio tetrafluorborato) se solubilizan en 5 ml de DMF. Después de 10 minutos de agitación, se añaden 64 mg de diisopropiletilamina. Después de 2 horas de agitación, se añaden 100 ml de éter etílico. El precipitado formado se filtra, se lava con éter etílico y se seca al vacío. Se obtienen 0,25 g de producto S (Rendimiento: 92,6 %).

25

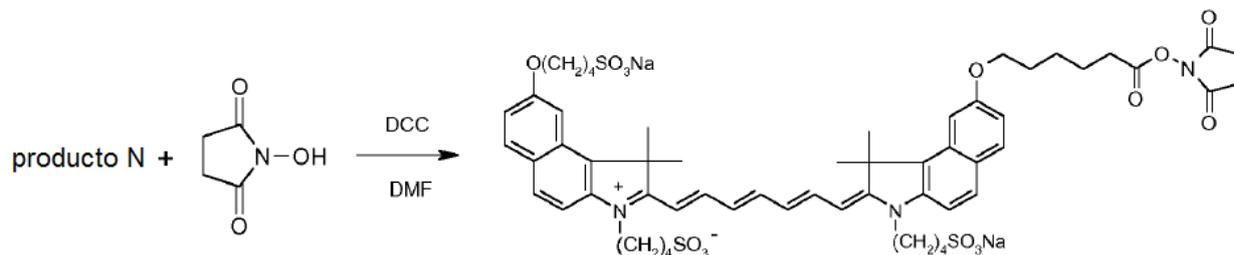
**EJEMPLO 20**



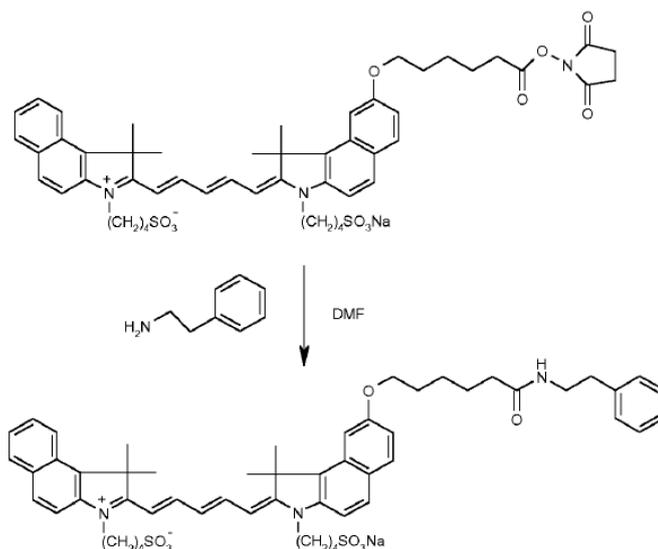
Succinimidil éster del producto M (producto T)

30 83 mg de producto M y 40 mg de TSTU se solubilizan en 5 ml de DMF. Después de 10 minutos de agitación, se añaden 25 mg de diisopropiletilamina. Después de 2 horas de agitación, se añaden 100 ml de éter etílico. El precipitado formado se filtra, se lava con éter etílico y se seca al vacío. Se obtienen 90 mg de producto T (Rendimiento: 96,8 %).

35

**EJEMPLO 21**5 Succinimidil éster del producto N (producto U)

1,08 g de producto N se solubilizan en 50 ml de DMF. Se añaden 0,57 g de N-hidroxisuccinimida y 0,26 g de dicitclohexilcarbodiimida. El medio de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, después se filtra. Se añaden 250 ml de éter etílico al filtrado. El precipitado formado se filtra y se seca al vacío. Se obtienen 0,99 g de producto U (Rendimiento: 84,2 %).

**EJEMPLO 22**

15

Fenetil amida del producto L (producto V)

93 mg de producto S y 39 mg de fenetilamina se solubilizan en 5 ml de DMF. Después de 45 minutos de agitación, se añaden 60 ml de éter etílico. El precipitado formado se filtra, se lava con éter etílico y se seca al vacío. Se obtienen 57 mg de producto V (Rendimiento: 61,3 %).

20

**EJEMPLO 23**Marcado de proteínas con el producto S

25

A una solución de 1 mg de proteína (peso molecular 150 kDa) en 0,5 ml de solución tampón fosfato (0,1 M) se añade 1 ml de tampón carbonato-bicarbonato de sodio (0,1 M, pH 9,3) que contiene 10 % de dimetilformamida, después se añaden 25  $\mu$ l de una solución de 9,1 mg de producto S en 2 ml de dimetilformamida gota a gota. La mezcla se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. 200  $\mu$ l de esta mezcla se eluyen en fracciones de 0,5 ml con tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4, 10 % de dimetilformamida) sobre una columna Sephadex G25/PD-10 (Amersham Biosciences) previamente equilibrada con 25 ml del mismo tampón. El colorante acoplado a la proteína se separa del colorante no acoplado por permeación en gel: la primera banda coloreada (fracciones 7 a 9) corresponde al colorante acoplado y la segunda banda coloreada (fracciones 14 a 17) corresponde al colorante libre. La lectura de las densidades ópticas a 685 nm indica una tasa de sustitución media de 4,7 moléculas de colorante por molécula de anticuerpo. El conjugado se conserva a 4 °C protegido de la luz.

30

35

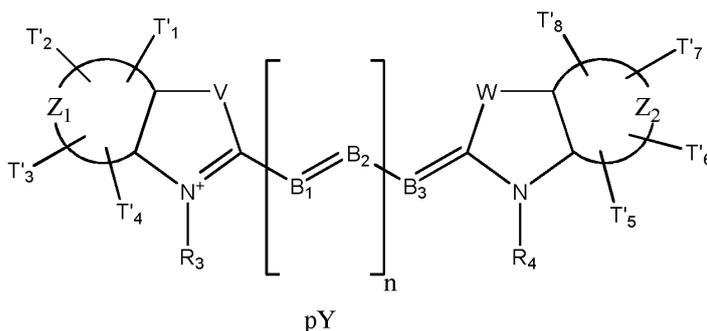
## REIVINDICACIONES

1. Marcador que consiste en un colorante unido covalentemente por uno o más carbonos de su estructura química a:

- 5 - uno o más grupos [FONC], y  
- opcionalmente uno o más grupos [SOL],

dicho marcador presenta la siguiente fórmula general (7):

(7)



10

en la que

15

- Z<sub>1</sub> y Z<sub>2</sub> representan cada uno, independientemente el uno del otro, los átomos necesarios para completar un núcleo benzindol o naftindol;

20

- V y W son cada uno, independientemente el uno del otro, seleccionados entre CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub> en el que R<sub>7</sub> y R<sub>8</sub>, son cada uno, independientemente los unos de los otros, seleccionados entre hidrógeno y un grupo (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>R<sub>10</sub>, o m es un número entero de 1 a 18 y R<sub>10</sub> se selecciona entre hidrógeno, amina, amonio cuaternario, aldehído, halógeno, ciano, arilo, heteroarilo, hidroxilo, amida, ácido sulfónico y sus sales, -COOH;

25

- n es un número entero de 1 a 10;

- R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> representan cada uno, independientemente los unos de los otros, un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, cicloalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, arilo, ariloxi, nitroalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, alquilamina, alquilamonio cuaternario que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, alquifosfato que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, ácido alquilsulfónico que tiene de 1 a 30 átomos de carbono y sus sales;

30

- T'<sub>1</sub> a T'<sub>8</sub> representan cada uno, independientemente, los unos de los otros:

35

- un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, sulfoalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, cicloalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, arilo, ariloxi, nitro, amina, amonio cuaternario, fosfato, ácido sulfónico y sus sales, OR<sub>11</sub> con R<sub>11</sub> seleccionado entre hidrógeno y un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, COOR<sub>11</sub> o CONHR<sub>11</sub> con R<sub>11</sub> como se ha definido previamente;
- [SOL]; o
- [FONC]

40

con la condición de que al menos uno de T'<sub>1</sub> a T'<sub>8</sub> representa [FONC], -B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> representan cada uno, independientemente los unos de los otros, un grupo metina (=CH-);

- Y representa un contraión seleccionado entre iones haluro, p-toluensulfonato, metansulfonato, trifluorometansulfonato, perclorato, acetato, sodio, potasio, calcio, magnesio, litio, amonio y trialquilamonio;

- p es un número entero de 0 a 8 necesario para la neutralidad de la molécula;

45

[FONC] se selecciona entre -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOSu, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOSuSO<sub>3</sub>Na, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOH, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-COOH, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COO-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>, -X-(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-COOSu, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NHCOCH<sub>2</sub>l, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NCS, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-COOSu y -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-OP[N(iPr)<sub>2</sub>][CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN], siendo X un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, siendo r un número entero de 1 a 18, siendo s un número entero de 3 a 18 y Su representa el grupo succinimidilo;

50

[SOL] representa, cada uno independientemente, un grupo X'-A'-Z', en el que:

- X' es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre,
- A' es un grupo alquileo o un grupo alquileo-arileno;

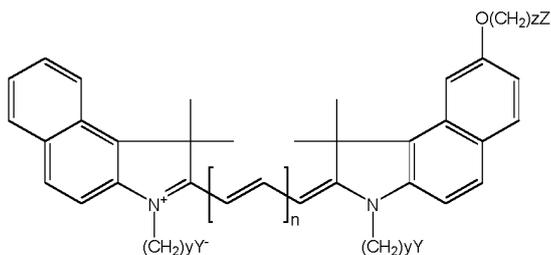
Z' se selecciona entre el grupo constituido por grupos ácido sulfónico y sus sales, amonio cuaternario, carbohidrato, glicol, hidroxilo, nitro, fosfato, alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, cicloalquilo que tiene de 3 a 14 átomos de carbono, alquiloxi que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, halogenalquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, hidroxialquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, alquiléster que tiene de 2 a 40 átomos de carbono, arilo, ariloxi, aril-(alquilo que tiene de 1 a 30 átomos de carbono), y halogenarilo;

**caracterizado por el hecho de que** el grupo alquileo es una cadena hidrocarbonada, cíclica, lineal o ramificada, que presenta dos enlaces libres, que contiene de 1 a 30 átomos de carbono, y **por el hecho de que** el grupo arileno es un grupo aromático que presenta dos enlaces libres, que contiene uno o más ciclos aromáticos, opcionalmente sustituidos.

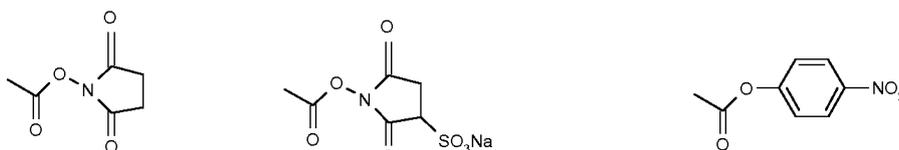
2. Marcador de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** [SOL] se selecciona entre -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub>Na, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-SO<sub>3</sub>H, -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> y -X-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-CH<sub>3</sub>, siendo X como se define en la reivindicación 1 y siendo r un número entero de 1 a 18.

3. Marcador de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** se selecciona entre el grupo que comprende

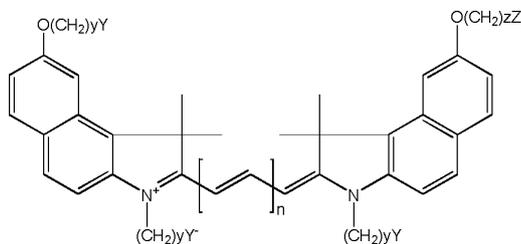
1)



en la que cada uno de y y n, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, z representa un número entero igual a 3, 4, 5, 6, 7 u 8, Z representa -COOH o



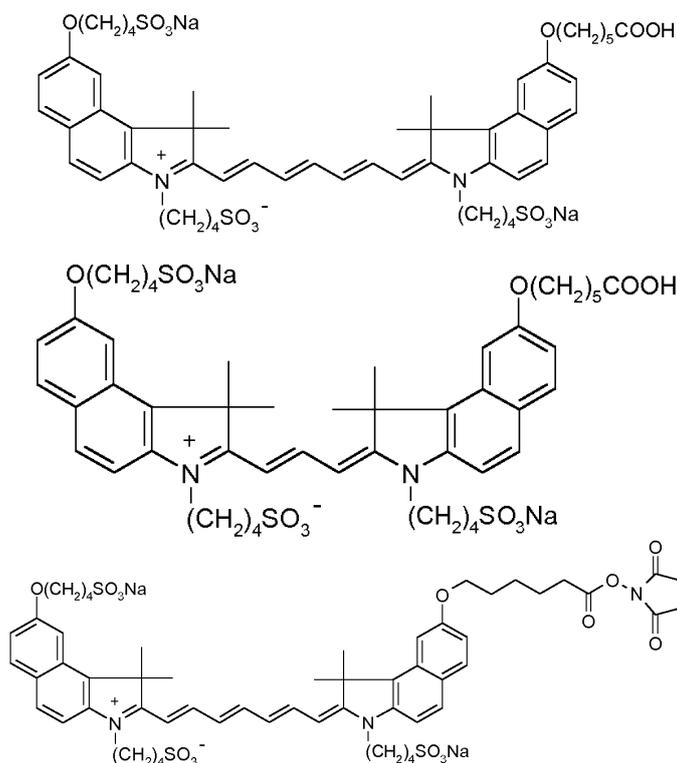
e Y representa SO<sub>3</sub> o SO<sub>3</sub>Na,  
2)



en la que cada uno de y y z, idénticos o diferentes, es un número entero igual a 3, 4, 5, 6, 7 u 8, n es un número entero igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, Z representa -COOH o



2)



5

5. Procedimiento de preparación de marcadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por el hecho de que** comprende una reacción de sustitución nucleófila entre:

10 o bien:

Z-A-L y [COLOR']-Nu

o bien:

15

[COLOR'']-L y Z-A-Nu

- Z y A son como se definen en la reivindicación 1;

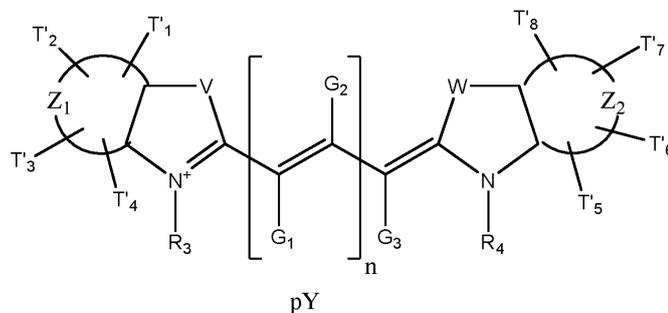
- L representa un grupo saliente seleccionado entre el grupo que consiste en un halógeno, un grupo metansulfonato, para-toluensulfonato y un grupo diazonio;

20

- Nu representa un grupo nucleófilo seleccionado entre el grupo que comprende -OH, -SH y -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cada uno, independientemente uno del otro, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo lineal o ramificado C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>,

[COLOR'] y [COLOR''] representa el colorante como se define en la reivindicación 1.

25

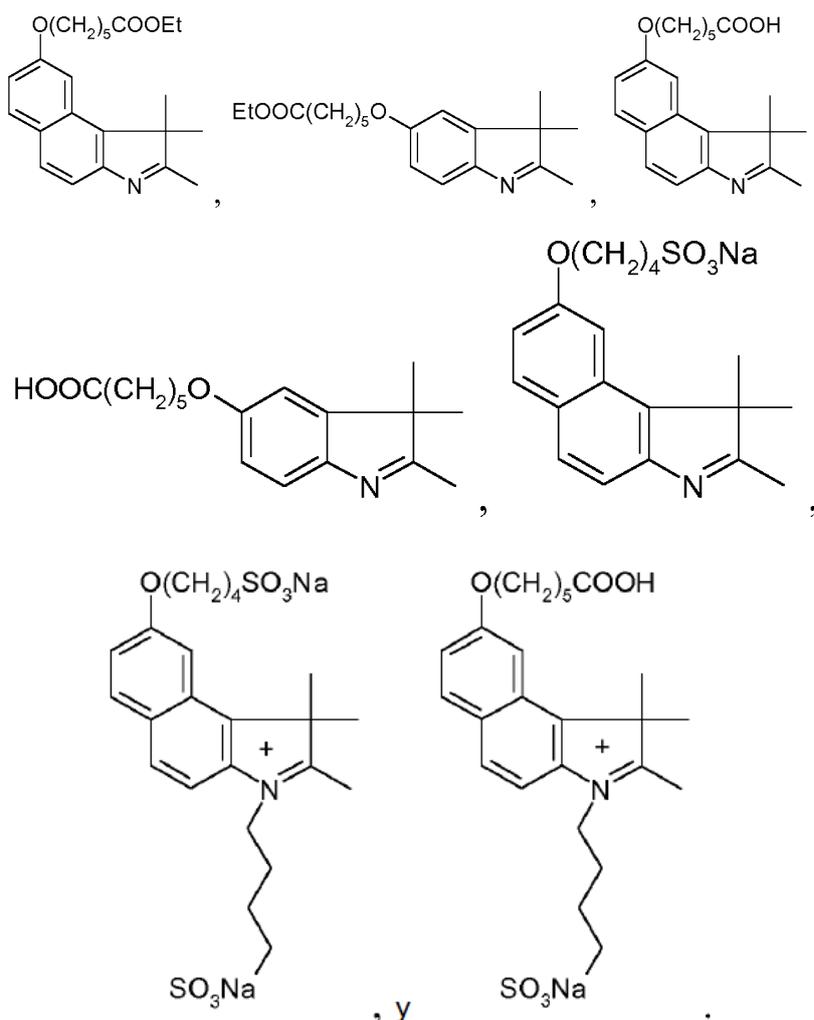


- en el que ninguno de T'<sub>1</sub> a T'<sub>8</sub> representa [SOL] o representa [FONC];

30

la reacción de sustitución nucleófila es una reacción de Williamson en presencia de una base.





5

12. Uso de un marcador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o preparado de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 8 en un método de marcado de moléculas biológicas.

- 10 13. Uso de un marcador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una reacción de acoplamiento en presencia de un agente de acoplamiento peptídico seleccionado entre el grupo que comprende los reactivos de tipo carbodiimida como DCC (diciclohexilcarbodiimida), carbonildiimidazol, IDDQ (1-isobutíloxycarbonil-2-isobutíloxi-1,2-dihidroquinolina), reactivos de tipo fosfonio como BOP (benzotriazol-1-iloxitris-(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato), reactivos de tipo uronio como HBTu (o-benzotriazolil-tetrametiluronio hexafluorofosfato) y TBTu (o-benzotriazoliltetrametiluronio tetrafluoroborato), reactivos de Woodward como N-etil-5-fenilisoaxazolio-3'-sulfonato, y reactivos de Curtius (hidracina y nitrito).

20

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, **caracterizado por el hecho de que** la reacción de acoplamiento se realiza en presencia de dimetilformamida.

15. Método de detección de una molécula biológica o no biológica que comprende el acoplamiento de un marcador de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 con dicha molécula, y la detección de dicha molécula acoplada al marcador por espectrometría de absorción, espectrometría de fluorescencia, espectrometría de infrarrojos, electroforesis, imagen médica en el infrarrojo cercano o infrarrojo.