(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 351**

(51) Int. Cl.:

C07C 211/63 (2006.01)
C07C 215/88 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2011** **PCT/GB2011/050702**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011** **WO11124927**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011** **E 11720571 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 2556047**

(54) Título: **Método de análisis de una célula u otro material biológico que contiene un ácido nucleico**

(30) Prioridad:

09.04.2010 GB 201005939

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2018

(73) Titular/es:

BIOSTATUS LIMITED (100.0%)
56A Charnwood Road
Shepshed, Leicestershire LE12 9NP, GB

(72) Inventor/es:

SMITH, PAUL JAMES;
ERRINGTON, RACHEL J. y
PATTERSON, LAURENCE HYLTON

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 676 351 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

Método de análisis de una célula u otro material biológico que contiene un ácido nucleico

Esta invención se refiere a un método de análisis de una célula u otro material biológico, a métodos de discriminación entre células intactas y no intactas, a sistemas de detección para los mismos, y también a determinados compuestos novedosos y a complejos fluorescentes que incluyen estos compuestos y un ácido nucleico. La invención tiene amplia variedad de aplicaciones en el análisis de células y otro material biológico, con referencia particular, aunque no exclusiva, a una clase de colorantes fluorescentes impermeantes a las células y a sus usos.

Los métodos para la determinación de la concentración celular y la viabilidad de los especímenes, incluyendo la discriminación de la integridad celular en muestras de células no fijadas y la tinción de material nucleico en muestras de células fijadas y permeabilizadas, son de uso común en las ciencias de la vida y en las industrias de asistencia sanitaria.

La capacidad para identificar procesos asociados con cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que predisponen, preceden y acompañan la muerte celular (por ejemplo, necrosis o apoptosis) es de amplio interés en las ciencias de la vida. Las tecnologías de sonda molecular, que se implementan fácilmente en las plataformas de citometría de flujo y microscopía, que permiten el estudio a nivel celular de tales procesos en muestras celulares no sometidas a fijación previa son particularmente atractivas (Darzynkiewicz, Juan *et al.* 1997). Se han desarrollado varios protocolos de tinción a base de colorante fluorescente para análisis de citometría de flujo y microscópico de células eucariotas y viabilidad bacteriana.

Los análisis de células vivas frente a células muertas han explotado previamente la capacidad de una célula intacta o metabólicamente activa para excluir la penetración de colorantes colorimétricos o fluorescentes en uno o más compartimentos celulares. En eucariotas superiores, esta propiedad se refiere principalmente a la integridad de la membrana plasmática, mientras que en eucariotas inferiores, sistemas procariotas y plantas, la composición y la disrupción de la pared celular también pueden afectar la penetración y el comportamiento del colorante. Se han descrito fases de transición desde estados celulares vivos a muertos, pero con frecuencia difieren entre células de diferentes tipos y en la rapidez y las formas de los procesos implicados. Se entiende que las células vivas, intactas o viables son aquellas que retienen tanto un grado de función metabólica como la integridad de la membrana plasmática sin implicar necesariamente capacidad proliferativa. La pérdida de la integridad de la membrana plasmática, en lugar de otros procesos de reorganización de la membrana, es un punto crítico en el proceso de muerte celular y da como resultado la posibilidad de que las células muestren un paso mejorado o más libre de moléculas, según sus propiedades específicas, entre el medio interno y los medios externos de la célula. Un ejemplo de reorganización de membrana durante la muerte celular se proporciona por la unión mejorada de las moléculas de anexina V a la superficie celular, pero debe distinguirse de la unión de anexina V a células con membranas alteradas que representan una fase posterior en la muerte celular asociada con tinción positiva mediante un colorante impermeante a las células.

Las células que presentan una integridad de la membrana comprometida pueden describirse como células no viables o no intactas y se entiende que incluyen células muertas, permeabilizadas o moribundas que muestran características de disrupción de la membrana. Este punto de transición crítico puede identificarse mediante la entrada mejorada de colorantes impermeantes a células vivas que proporcionan una definición funcional de muerte celular y un método de análisis. Preferiblemente tales colorantes tendrán la capacidad de unirse a la estructura intracelular residual y, por tanto, se acumulan preferiblemente dentro de la fracción de células no intactas dentro de una población. Se entiende que hay una retención relativamente a largo plazo de ácido nucleico residual que porta estructuras durante la muerte celular y el eventual desensamblaje de la unidad celular en múltiples fragmentos frecuentemente identificados como residuos.

Pueden usarse tinciones vitales para detectar, y por tanto seleccionar, una población de células. Esto es particularmente ventajoso en ensayos que requieren retención de la funcionalidad de células vivas, no comprometidas. Un enfoque es valorar positivamente la viabilidad mediante la detección de metabolismo celular activo que puede determinarse mediante la conversión intracelular de un sustrato no fluorescente permeante a las células en un producto muy fluorescente que se retiene preferiblemente dentro de células intactas (por ejemplo, metabolismo de diacetato de fluoresceína mediante actividad de esterasa inespecífica intracelular) identificando positivamente de ese modo una fracción viable. En tales casos la exclusión de células con integridad comprometida actúa para mejorar la validez de la información derivada del ensayo. Por otro lado, tintes impermeantes a células vivas entrarán en células con la membrana comprometida que están muertas o están en fases tardías de apoptosis o muerte celular. En tal caso de colorantes de unión a ADN impermeantes a las células, se usa la entrada de colorante e interacciones posteriores con ácidos nucleicos residuales intracelulares para notificar el estado comprometido de la membrana de una célula dada. En tales casos, el “complejo” entre el colorante intracelular y los ácidos nucleicos residuales, preferiblemente ADN, es el principio notificador. En este caso, el reactivo ya no se excluye de estas células y tiene ahora accesibilidad para la formación de complejos y por tanto proporciona una tinción negativa para la viabilidad y una tinción positiva para células comprometidas.

Se entiende que las muestras de células también pueden procesarse usando métodos de fijación para permitir el análisis de características celulares como parte de un amplio intervalo de técnicas usadas en las ciencias de la vida. El método de fijación y los métodos de permeabilización celular pueden variar pero dan como resultado frecuentemente cambios en la membrana que permiten la entrada de colorantes impermeantes a células vivas.

La entrada de colorante se indica preferiblemente mediante la adquisición de una señal de fluorescencia asociada con la unión de alta afinidad del colorante a ácidos nucleicos intracelulares y se considera invariablemente que está ayudada por la mejora de fluorescencia tras la unión.

Los colorantes fluorescentes impermeantes a las células (y permeantes a las células), que se unen variablemente a ácidos nucleicos, son un grupo grande de sondas moleculares usadas ampliamente en las ciencias biológicas y están fácilmente disponibles de proveedores comerciales. Las características buscadas de estos agentes incluyen: selectividad de ácidos nucleicos, características de excitación y emisión, rendimiento cuántico, el potencial de mejora de la fluorescencia tras la unión, rendimiento en medios acuosos, grado de exclusión de células no comprometidas (que proporcionan una tinción negativa para viabilidad y una tinción positiva para muerte celular) o rapidez de penetración en células intactas para ensayos de células intactas. La selección de un colorante particular se determina a menudo mediante el grado de solapamiento espectral con otros fluoróforos incorporados en un ensayo y la disponibilidad de fuentes de luz convenientes para excitación selectiva u óptima.

Puesto que el proceso de muerte celular implica frecuentemente la adquisición secuencial de cambios en las propiedades celulares a lo largo de un periodo ampliado (de minutos a días) existe la necesidad de colorantes impermeantes a las células que tienen toxicidad despreciable de modo que la presencia continua de un colorante proporcionado no influye en la notificación de la pérdida de viabilidad dentro de un ensayo. Se prefiere un colorante impermeante a las células no tóxico para la monitorización continua de pérdida de viabilidad en ensayos a largo plazo.

Se reconoce que el grado de las propiedades de tinción de fluorescencia de cromatina celular, en células con niveles variables de integridad estructural, mediante colorantes permeantes e impermeantes es complejo y no se predice fácilmente (Wlodkowic, Skommer *et al.* 2007). Las células que experimentan procesos de muerte celular, que permiten la entrada celular de colorantes indicadores de otro modo impermeantes a las células, también experimentan cambios en las estructuras celulares no menos en la conformación de cromatina. Con frecuencia se observa tinción hipercromática de núcleos apoptóticos con colorantes catiónicos de absorción mientras que los núcleos celulares apoptóticos a menudo aparecen tenues con muchos fluorocromos de ADN. El entendimiento actual es que la afinidad mejorada de la cromatina de células apoptóticas tempranas para colorantes catiónicos se asocia con relajación conformacional en vez de degradación de ADN (Erenpreisa, Freivalds *et al.* 1997). En células apoptóticas tardías, el empaquetamiento muy denso de ADN degradado promueve la agregación adicional de colorantes (Erenpreisa, Freivalds *et al.* 1997) que afectan a las propiedades de fluorescencia (Erenpreisa, Freivalds *et al.* 1997).

La tinción fluorescente de células con colorantes dirigidos a ácidos nucleicos es, por tanto, una matriz compleja de estado celular, propiedades de permeación, especificidad de unión a colorantes, modos de unión a colorantes e interacciones colorante-colorante. Para compensar tales problemas en ensayos basados en células, el enfoque tradicional ha sido preferir mejora de alta fluorescencia y colorantes de alto rendimiento cuántico. Se han encontrado aplicaciones para un amplio intervalo de colorantes impermeantes a las células en la tinción de ácidos nucleicos. El ejemplo usado más frecuentemente es yoduro de propidio (PI).

La señal intensamente fluorescente de PI tiene la ventaja de una detección simple y sencilla, pero hay desventajas cuando este fluorocromo se incorpora en análisis de múltiples colores. Además, PI tiene la capacidad de excitarse a longitudes de onda UVA (por ejemplo, 365 nm) y mediante longitudes de onda de luz azul (por ejemplo, 488 nm), lo que complica su aplicación cuando se usa excitación diferencial para distinguir un analito fluorescente o un analito detectado mediante una sonda fluorescente. PI no tiene firma colorimétrica para análisis conveniente de tinción celular. En particular, debe aplicarse compensación a las señales agrupadas en partes del espectro visible adyacente a la región de emisión pico que está analizándose para justificar PI por “derrame”. Además, las emisiones de fluorescencia de PI pueden ocupar una región del espectro en la que las emisiones que se originan a partir de un analito fluorescente, o un analito detectado mediante una sonda fluorescente, pueden necesitar distinguirse. PI ofrece alguna ventaja espectral como colorantes impermeantes a células vivas que emiten en la región roja y más allá (por ejemplo > 620 nm de longitud de onda).

Se entiende que la intensidad de alta fluorescencia de PI unido a ADN requiere frecuentemente análisis de señales de fluorescencia adquiridas de poblaciones celulares en una escala logarítmica que proporcionan un intervalo dinámico amplio para las subpoblaciones celulares de identificación.

El documento US 5.057.413 enseña el uso del colorante de ácido nucleico permeante a las células LDS-751 en donde la preferencia por ADN distingue entre células dañadas e intactas basándose en la cantidad de fluorescencia emitida. En otro ejemplo, se permite una distinción entre células intactas y muertas usando el colorante 7-AAD (con

bajas propiedades de permeación de células intactas) en la valoración de leucemia/linfoma de citometría de flujo de la expresión del marcador de leucocitos (CD45) para evitar los errores de la tinción inespecífica (Shenkin, Babu *et al.* 2007). En aún otro ejemplo, la solicitud de patente estadounidense 20070082377 da a conocer el uso del colorante de ADN impermeante a las células 7-AAD como componente en ensayos de múltiples parámetros que también utilizan una sonda fluorescente que es una tinción de membrana, y una sonda fluorescente que es una sonda de detección de apoptosis permeable a las células que se une a enzimas caspasa activas. Tales enfoques permiten la distinción entre células muertas o necróticas (detectadas usando el tinte vital 7-AAD; cuando este tinte se une a o se intercala con ADN, se vuelve detectable, por ejemplo, a través de un proceso de mejora de la fluorescencia tras la unión a un ácido nucleico) y células apoptóticas caracterizadas por actividad caspasa modificada.

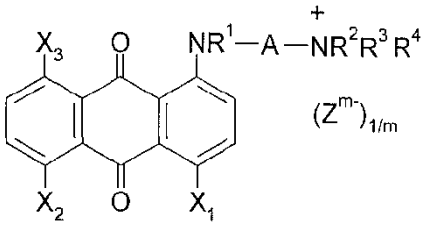
Se conocen ensayos de "colorante dual" que utilizan colorantes permeantes a las células e impermeantes a las células (Giao, Wilks *et al*, 2009; Biggerstaff, Le Puil *et al*, 2006; Lehtinen, Nuutila *et al* 2004; Wlodkowic y Skommer, 2007a; Wlodkowic y Skommer, 2007b). Los colorantes usados se optimizan invariablemente para el rendimiento individual y buscar eficazmente evitar interacciones de modo que las células pueden notificar características de permeación con fiabilidad. Las matrices de colorante dual comentadas anteriormente tienen individualmente diversas desventajas y propiedades desfavorables que se asocian con los sistemas precisos empleados. Sin embargo, también existe un problema fundamental en ensayos de colorante dual que, sin excepción, los tintes de ácido nucleico permeantes a células de unión directa también teñirán ácidos nucleicos en células con membranas comprometidas o alteradas.

El intervalo dinámico de señales obtenidas a partir de colorantes permeantes a las células e impermeantes a las células tal como se describió anteriormente posibilita métodos de análisis convenientes.

Además, hay una necesidad en curso de mejorar las propiedades útiles de colorantes fluorescentes para el análisis de células y otro material biológico.

La presente invención, en al menos algunas de sus realizaciones, aborda los problemas y necesidades descritos anteriormente. En particular, la presente invención, en al menos algunas de sus realizaciones, proporciona colorantes impermeantes a las células mejorados, y también proporciona un sistema mejorado que puede usarse para discriminación de células vivas/muertas usando colorantes impermeantes a las células y permeantes a las células. En algunas realizaciones, la invención proporciona colorantes impermeantes a las células que tienen una emisión preferida en el rojo lejano (por ejemplo > 660 nm de longitud de onda o > 690 nm de longitud de onda) y con emisión reducida en la región espectral naranja/roja (por ejemplo > 530 < 620 nm de longitudes de onda).

Dentro de la presente divulgación se describe un compuesto de fórmula (I):



(I)

en el que: A es un grupo alquileno C_{2-8}; R^1, R^2, R^3, y R^4 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, dihidroxialquilo C_{2-4} en el que el átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno no porta un grupo hidroxilo y ningún átomo de carbono se sustituye con dos grupos hidroxilo, o R^2 y R^3 forman juntos un grupo alquileno C_{2-6} que con el átomo de nitrógeno al que R^2 y R^3 se unen forma un anillo heterocíclico;

X_1, X_2 y X_3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, NR^1-A-$NR^2R^3R^4$+$(Z^{m-})_{1/m}$, halógeno-amino, alcoxilo C_{1-4} o alcanoiloxilo C_{2-8}; y

$(Z^{m-})_{1/m}$ es un anión de carga m;

o un derivado en el que el grupo NR^1 se cuaterniza.

Preferiblemente m es 1.

Se asocian numerosas ventajas con al menos algunos de estos compuestos cuando se usan como colorantes para analizar células y otro material biológico. Las ventajas incluyen:

- Solubilidad en agua para incorporación fácil en ensayos a un intervalo de concentraciones compatible con las condiciones de tampón isotónico frecuentemente usadas en ensayos a base de células.

- Pureza y estabilidad química para implementación reproducible dentro de múltiples ensayos y almacenamiento conveniente.

- Propiedades de fluorescencia de rojo/rojo lejano para incorporación fácil en ensayos de múltiples parámetros con fluoros de rango visible con poco o nada de solapamiento espectral, o fluorescencia naranja para uso fácil con fluoros rojos.

- Propiedades de unión de ácido nucleico de alta afinidad para aplicaciones que requieren el análisis de células nucleadas.

- Sin mejora de la fluorescencia tras la unión a un ácido nucleico para permitir un grado conocido de estequiometria entre la intensidad de emisión de fluorescencia y el grado de unión a ADN.

- Baja fluorescencia intrínseca para proporcionar una reducción relativa en fluorescencia de fondo de colorante no unido frente a la señal aumentada tras unión nuclear que puede atribuirse a la concentración localizada de moléculas unidas.

- Propiedades impermeantes a las células para tinción selectiva y positiva de células con membrana comprometida o que tienen una incapacidad para excluir moléculas de colorante.

- Propiedades de discriminación nucleares en células fijadas para su uso como tinte de ADN directo para todas las células nucleadas con detección de emisión de fluorescencia mediante obtención de imágenes o citometría de flujo u otras plataformas de detección.

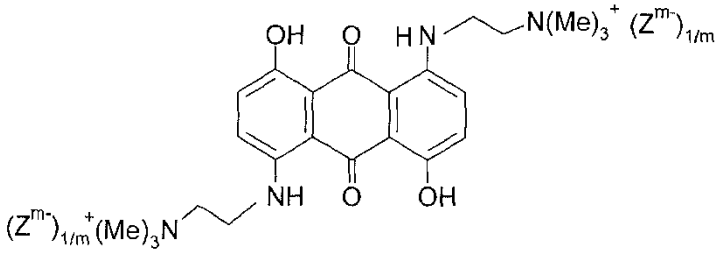
- Baja toxicidad hacia células intactas de modo que el colorante puede incubarse conjuntamente con células durante periodos ampliados durante una aplicación biológica sin efectos perjudiciales tales como la inhibición de proliferación.

- Una combinación de las propiedades anteriores que permite el análisis dependiente del tiempo de la pérdida de integridad celular monitorizada mediante la incubación de células con un colorante impermeante a las células durante periodos variables y el muestreo episódico de la misma población para la detección de tinción celular.

La presente divulgación describe compuestos de aminoalquilamino y antraquinona cuaternizados que pueden usarse, entre otros, como colorantes fluorescentes. Un sustituyente de aminoalquilamino cuaternizado está presente en al menos la posición 1. Pueden estar presentes sustituyentes de aminoalquilamino cuaternizados adicionales en las posiciones 4, 5 u 8, o combinaciones de las mismas. Las publicaciones internacionales WO91/05824 y WO99/65992 dan a conocer diversos tipos de compuestos de aminoalquilamino antraquinona que pueden usarse como precursores para la síntesis de compuestos de la presente invención.

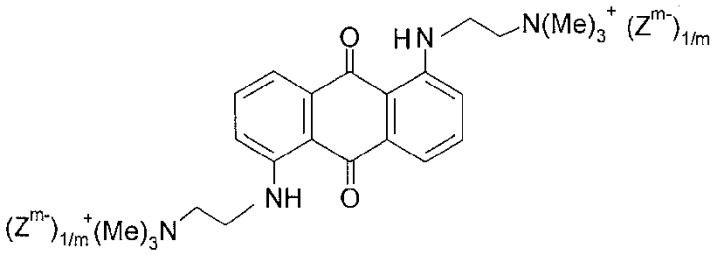
En la invención reivindicada, el compuesto es de fórmula (IA) o (IB).

En una realización particularmente preferida, el compuesto es de fórmula (IA):



(IA)

Otro compuesto preferido es una fórmula (IB):



(IB)

Los compuestos indicados a continuación proporcionan ejemplos específicos de compuestos de la divulgación en combinación con un contraanión adecuado, tal como yoduro.

1-{[2-(trimetilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona

1-{[2-(trimetilamino)etil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trimetilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trimetilamino)etil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trimetilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trimetilamino)etil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1-{[2-(trietilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona

1-{[2-(trietilamino)etil]amino}5,8dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,5-Bis{[2-(trietilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona

1,5-Bis{[2-(trietilamino)etil]amino}5,8dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trietilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trietilamino)etil]amino}5,8dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trietilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trietilamino)etil]amino}5,8dihidroxiantraceno-9,10-diona

yoduro de 1-{[2-(trimetilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trimetilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,5-Bis{[2-(trimetilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trimetilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1-{[2-(trietilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,5-Bis{[2-(trietilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trietilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trietilamino)propil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,5-Bis{[2-(trietilamino)butil]amino}antraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trietilamino)butil]amino}antraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trietilamino)butil]amino}antraceno-9,10-diona

1,5-Bis{[2-(trietilamino)butil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,4-Bis{[2-(trietilamino)butil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

1,8-Bis{[2-(trietilamino)butil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona

Los compuestos de la presente invención pueden incluir cualquier contraanión adecuado. Ejemplos de contraaniones son haluros tales como cloruro, bromuro y yoduro, aniones fisiológicamente aceptables derivados de ácidos inorgánicos tales como ácidos fosfóricos y sulfúricos, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ascórbico, benzoico, cítrico, fumárico, glucónico, isetiónico, láctico, maleico, málico, metanosulfónico, oxálico, succínico, sulfámico y tartárico.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse convenientemente mediante cuaternización de un compuesto precursor de aminoalquilamino al compuesto de fórmula (I). El proceso de cuaternización puede comprender alquilación del precursor (por ejemplo, usando un reactivo de haluro de alquilo) o cuaternización a través de la formación de una sal de adición de ácido usando un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Los compuestos de aminoalquilamino y antraquinona comentados previamente en relación con las publicaciones internacionales WO91/05824 y WO99/65992 pueden servir como compuestos precursores adecuados a la etapa de cuaternización. Otras vías para la síntesis de los compuestos precursores que se cuaternizan para producir los compuestos de la presente invención serán fácilmente evidentes para el lector experto.

Se da a conocer pero no se reivindica una composición que incluye un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente con un diluyente o portador fisiológicamente aceptable.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un complejo fluorescente que incluye un ácido nucleico y un compuesto de fórmula (IA) o (IB).

El ácido nucleico puede ser ADN, y el ADN puede estar presente en una célula. El ADN puede estar presente en una célula no intacta.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método de análisis de una muestra de células u otro material biológico que contiene ácido nucleico que incluye las etapas de:

a) preparar una disolución biológicamente compatible que contiene un compuesto de fórmula (IA) o (IB) ;

b) tratar una muestra de células u otro material biológico con la disolución biológicamente compatible; y

c) detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB).

Ventajosamente, la propiedad espectroscópica asociada con absorción de radiación electromagnética mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB) es fluorescencia, y la etapa c) incluye excitar el compuesto de fórmula (IA) o (IB) con radiación electromagnética, y detectar una señal de fluorescencia emitida. Puede medirse la intensidad de fluorescencia en regiones espectrales predefinidas, aunque pueden usarse otros esquemas de detección, tales como mediciones de tiempos de vida de fluorescencia.

Alternativamente, la propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB) puede ser una propiedad colorimétrica.

Ventajosamente, el método puede usarse para la discriminación de núcleos celulares en la muestra de células, en el que la etapa b) se realiza para provocar la unión de ácido nucleico en núcleos celulares mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB), y la discriminación de los núcleos celulares se basa al menos en parte en la propiedad espectroscópica detectada en la etapa c).

La etapa b) puede realizarse para teñir la muestra de células con el compuesto de fórmula (IA) o (IB). Ventajosamente, el método puede ser uno en el que el incremento de muerte celular se monitoriza, en el que la etapa b) se realiza antes de o durante un periodo de ensayo permitiendo de ese modo una lectura continua o frecuente de incremento de muerte celular durante el periodo de ensayo. Los compuestos de fórmula (IA) se prefieren particularmente para su uso en estos métodos. Este enfoque se aprovecha de la no toxicidad de compuestos impermeantes de la presente invención. Esto significa que es posible incluir un compuesto de fórmula (IA) o (IB) con una mezcla de células de modo que el compuesto de fórmula (IA) o (IB) está presente durante la prueba. Según muere una célula (por ejemplo, de la influencia de un compuesto de prueba en un ensayo) la célula se tiñe con el compuesto de fórmula (IA) o (IB). El compuesto de fórmula (IA) o (IB) puede añadirse antes, durante o después de cualquier tratamiento que pueda provocar muerte celular. Esto permite el muestreo durante una prueba que puede realizarse de forma continua.

La etapa c) puede incluir detectar la fluorescencia emitida por células individuales mediante citometría de flujo, detección de ubicación intracelular mediante microscopía de fluorescencia, o cualquier otro tipo adecuado de técnica

de detección basada en fluorescencia. Pueden emplearse técnicas de obtención de imágenes. Se entiende que puede emplearse una variedad de sistemas de obtención de imágenes para el análisis de señales de fluorescencia, incluyendo pero no exclusivamente intensidad de fluorescencia, polarización, tiempo de vida de fluorescencia, espectro de fluorescencia, y disposición espacial de tales cualidades dentro de un espécimen o muestra que está analizándose.

En determinadas realizaciones preferidas, se analizan células fijadas o permeabilizadas, en las que la muestra de células se fija mediante tratamiento con un agente de fijación o permeabilización. La discriminación y tinción de núcleos celulares en células fijadas y permeabilizadas son realizaciones particularmente preferidas.

En otras realizaciones preferidas, la etapa b) incluye además tratar la muestra con al menos otro fluorocromo o compuesto de emisión de luz, y la etapa c) incluye además detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el fluorocromo o compuesto de emisión de luz.

Las etapas b) y c) asociadas con el otro fluorocromo o compuesto de emisión de luz pueden realizarse simultáneamente con, o por separado de, las etapas b) y c) asociadas con el compuesto de fórmula (IA) o (IB).

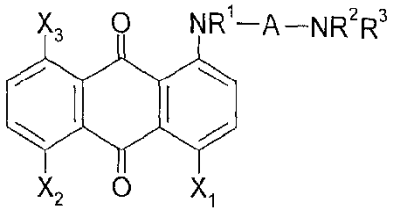
En una realización particularmente preferida, el método discrimina entre células intactas y no intactas, en el que el compuesto de fórmula (IA) o (IB) es impermeante a las células, la etapa b) incluye además tratar la muestra con un segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz que es permeante a las células, y la etapa c) incluye además detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz, en el que la detección de la propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB) se correlaciona con la presencia de células no intactas, y la detección de la propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz se correlaciona con la presencia de células intactas.

Se entiende que las células no intactas incluyen células muertas, y células dañadas con membranas comprometidas o alteradas.

Ventajosamente, el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz tiene un potencial de unión (que está preferiblemente, pero no necesariamente, relacionado con la afinidad de unión) por ácido nucleico y/u otro material macromolecular en las células discriminadas que es menor que el del compuesto de fórmula (IA) o (IB) y como consecuencia compite menos eficazmente en presencia del compuesto de fórmula (IA) o (IB) para unirse al ácido nucleico y/u otro material macromolecular en las células discriminadas de modo que el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz se excluye sustancialmente de la unión a células no intactas o se enmascara mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB).

La exclusión completa preferida del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB) en células dañadas proporciona una discriminación óptima basándose en el análisis dual de emisiones de fluorescencia. Además, la señal de fluorescencia del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz se elimina eficazmente en células dañadas marcadas óptimamente con compuesto de fórmula (IA) o (IB) pero también podría detectarse a un nivel atenuado cambiando simplemente la razón del compuesto de fórmula (IA) o (IB) con respecto a la del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz que proporciona un análisis de fluorescencia radiométrico logrado mediante la variedad de condiciones de tinción conjunta tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, las razones molares de compuestos del compuesto de fórmula (IA) o (IB) con respecto a la del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz estaría dentro del intervalo de 1:10 y 10:1 y más preferiblemente 3:20. Preferiblemente, la tinción de células intactas que notifican exclusivamente la presencia del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz proporciona información adicional de valor en la determinación del estado celular incluyendo, pero no exclusivamente: biomasa celular relacionada con la unión a colorante total y la presencia de ácido nucleico intracelular como discriminador de fluorescencia positivo para células nucleadas. Indicaciones preferibles de cambios en la biomasa celular permiten que se realice la distinción entre células que continúan avanzando metabólicamente sin intervención de división celular preferiblemente en el análisis de célula que experimenta inhibición a largo plazo de proliferación o detención del ciclo celular.

Preferiblemente, el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz es un compuesto de fórmula (II):



(II)

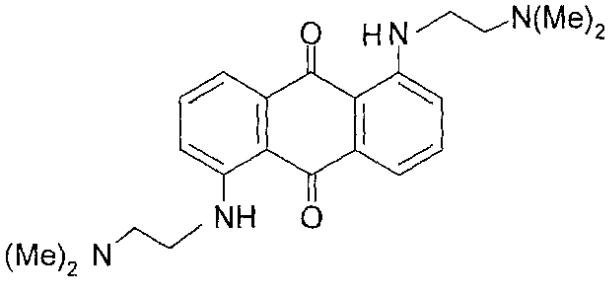
o un derivado N-óxido del mismo;

en el que: A es un grupo alquileno C_{2-8}; R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, dihidroxialquilo C_{2-4} en el que el átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno no porta un grupo hidroxilo y ningún átomo de carbono se sustituye con dos grupos hidroxilo, o R^2 y R^3 forman juntos un grupo alquileno C_{2-6} que con el átomo de nitrógeno al que R^2 y R^3 se unen forma un anillo heterocíclico; y

X_1, X_2 y X_3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, NR^1-A-NR^2R^3, halógeno-amino, alquiloxilo C_{1-4} o alcanoiloxilo C_{2-8}.

En realizaciones preferidas el compuesto de fórmula (II) es una antraquinona sustituida en 1,5 amino, es decir, X_2 es NR^1-A-NR^2R^3 pero X_1 y X_3 no lo son.

Una realización particularmente preferida de esta clase de antraquinonas sustituidas en 1,5 amino es un compuesto de fórmula (IIA)



(IIA)

Ventajosamente, se realiza la discriminación entre células intactas y no intactas después de que la muestra de células se exponga a un agente que es potencialmente citotóxico o de otro modo, capaz de inducir muerte celular, con fines de monitorizar el efecto del agente sobre la muestra de células.

En realizaciones adicionales preferidas, la etapa b) incluye además tratar la muestra con al menos un tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz, y la etapa c) incluye además detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante al menos el tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz y correlacionar dicha propiedad espectroscópica con una característica o propiedad de células intactas y/o células no intactas.

La propiedad espectroscópica detectada del tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz puede ser similar a la propiedad espectroscópica detectada del compuesto de fórmula (IA) o (IB) y distinta de la propiedad espectroscópica detectada del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz, en el que la propiedad espectroscópica detectada del tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz se correlaciona con una característica o propiedad de células intactas.

La propiedad espectroscópica detectada del tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz puede ser similar a la propiedad espectroscópica detectada del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz y distinta de la propiedad espectroscópica detectada del compuesto de fórmula (IA) o (IB) en la que la propiedad espectroscópica detectada del tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz se correlaciona con una característica o propiedad de células no intactas.

Preferiblemente, las propiedades espectroscópicas detectadas en la etapa c) son fluorescencia emitida en una región predefinida del espectro electromagnético, y la etapa c) incluye excitar el compuesto de fórmula (IA) o (IB) el segundo y, opcionalmente, el tercer y cualquier otro, fluorocromo o compuesto de emisión de luz con radiación electromagnética.

Ventajosamente, el compuesto de fórmula (IA) o (IB), el segundo y, opcionalmente, el tercer fluorocromo o compuestos de emisión de luz se excitan conjuntamente mediante una única fuente de radiación electromagnética.

Ventajosamente, la fluorescencia emitida del tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz está en una región predefinida del espectro electromagnético que es i) similar a la de la fluorescencia emitida del compuesto de fórmula (IA) o (IB), preferiblemente en región roja y/o IR cercano, y ii) diferente de la fluorescencia emitida del segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz. El tercer fluorocromo pueden ser nanocristales Qdot que emiten a 705 nm.

Ventajosamente, la fluorescencia emitida del tercer fluorocromo o compuesto de emisión de luz está en una región predefinida del espectro electromagnético que es i) similar a la de la fluorescencia emitida del segundo fluorocromo

o compuesto de emisión de luz, preferiblemente en la región naranja, y ii) diferente de la fluorescencia emitida del compuesto de fórmula (IA) o (IB).

En realizaciones en las que el método discrimina entre células intactas y no intactas, la etapa c) puede realizarse usando citometría de flujo, y o usando microscopía de fluorescencia para proporcionar información sobre la ubicación celular de emisiones de fluorescencia. Se entiende que puede emplearse una variedad de sistemas de obtención de imágenes para el análisis de señales de fluorescencia, incluyendo pero no exclusivamente intensidad de fluorescencia, polarización, tiempo de vida de fluorescencia, espectro de fluorescencia, y disposición espacial de tales cualidades dentro de un espécimen o muestra que está analizándose.

La etapa c) puede incluir además mediciones de dispersión de luz de células. Sin embargo, pueden obtenerse resultados útiles sin requerir que también se realicen mediciones de dispersión de luz.

Pueden realizarse mediciones a lo largo de un periodo de tiempo con fines de adquirir una fecha de resolución temporal, por ejemplo, para examinar cambios incrementados en la integridad celular o para examinar cambios en células intactas discriminadas tal como se determina mediante características correlacionadas con la presencia de los segundos y/o terceros fluorocromos o compuestos de emisión de luz.

Según un cuarto aspecto de la invención se proporciona un método de discriminación entre células intactas y no intactas que incluye las etapas de:

a) preparar una disolución biológicamente compatible que contiene un fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células de fórmula (IA) o (IB);

b) preparar una disolución biológicamente compatible que contiene un fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células que tiene un potencial de unión (que está preferiblemente, pero no necesariamente, relacionado con la afinidad de unión) por ácido nucleico y/u otro material macromolecular en las células discriminadas que es menor que el del fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células, y como consecuencia compite menos eficazmente en presencia del fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células para unirse al ácido nucleico y/u otro material macromolecular en las células discriminadas de modo que el fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células se excluye sustancialmente de la unión a células no intactas o se enmascara por el fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células;

c) tratar una muestra de células con la disolución o disoluciones biológicamente compatibles; y

d) detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células y correlacionarla con la presencia de células no intactas, y detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células y correlacionarla con la presencia de células intactas.

Además de los colorantes permeantes a las células comentados anteriormente, pueden usarse los siguientes colorantes como fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células (“número/número” indica longitudes de onda en nm para excitación máx frente a emisión máx):

Colorantes de cianina permeantes a las células (los tintes de ácido nucleico SYTO) con menor afinidad que los colorantes SYTOX y que pueden entrar en células vivas son preferiblemente pero no exclusivamente tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 40 blue, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 59 red, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 60 red, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 61 red, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 62 red, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 63 red, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 64 red, tinte de ácido nucleico SYTOX® Blue, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 40 blue, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 41 blue, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 42 blue, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 45 blue, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 80 orange, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 81 orange, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 82 orange, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 83 orange, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 84 orange, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 85 orange, tinte de ácido nucleico SYTOX® Orange, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 10 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 9 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® BC green, tinte de células muertas SYTOX® Blue, tinte de ácido nucleico SYTOX® Green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 21 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 24 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 25 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 11 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 12 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 13 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 14 green, tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 16 green, y tinte de ácido nucleico fluorescente SYTO® 17 red

DAPI: fluorocromo de unión a ADN excitable por UV 4',6-diamidino-2-fenilindol, clorhidrato (DAPI) (Ex358/Em46) o 4',6-diamidino-2-fenilindol, dilactato (DAPI, dilactato)

Colorantes Hoechst de unión al surco menor preferiblemente pero no exclusivamente Hoechst 34580, Hoechst 33258 (bis-bencimida) como pentahidrato que es un fluorocromo selectivo de ADNbc de unión al surco menor, selectivo de AT, azul fluorescente (Ex352/Em461), Hoechst 33342: como triclorhidrato, trihidrato, que es un fluorocromo de unión selectivo de ADNbc de unión al surco menor, selectivo de AT, azul fluorescente (Ex350/Em461)

LDS 751 es un tinte de ácido nucleico: (Ex543/Em712) (ADN) (Ex590/Em607) (ARN)

7-Aminoactinomicina D (7-AAD; Ex546/Em647)

Naranja de acridina que muestra la tinción metacromática de células con emisión sesgada roja con ARN y emisión sesgada verde para ADN

Además de los colorantes impermeantes a las células comentados anteriormente, pueden usarse los siguientes colorantes como fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células ("número/número" indica longitudes de onda en nm para excitación máx frente a emisión máx):

Dímeros de cianina de los colorantes de dímero de la familia TOTO, preferiblemente pero no exclusivamente yoduro de TOTO®-1 (514/533), yoduro de TO-PRO®-1 (515/531), yoduro de TOTO®-3 (642/660)

Monómeros de cianina de la familia TO-PRO de colorantes, preferiblemente pero no exclusivamente YO-PRO-1 (Ex491/Em509), TO-PRO-1 (Ex515/Em531), yoduro de TO-PRO®-3 (642/661), yoduro de TO-PRO®-5 (745/770), yoduro de YOYO®-1 (491/509), yoduro de YO-PRO®-1 (491/509), yoduro de YOYO®-3 (612/631), yoduro de YO-PRO®-3 (612/631)

Colorantes de ácido nucleico SYTOX preferiblemente pero no exclusivamente SYTOX Blue (Ex445/Em470), SYTOX Green (Ex504/Em523) y SYTOX Orange (Ex547/Em570)

Yoduro de propidio (PI; Ex530/Em625) y *bromuro de etidio impermeante a las células* (EtBr; Ex518/Em605)

7-Aminoactinomiacina D (7-AAD; Ex546/Em647)

Tinción metacromática con *naranja de acridina* de células con emisión sesgada roja con ARN y emisión sesgada verde para ADN

Se entiende que puede emplearse una variedad de sistemas de detección para el análisis de las diferentes señales de fluorescencia obtenidas usando la invención, incluyendo pero no exclusivamente intensidad de fluorescencia, polarización, tiempo de vida de fluorescencia, espectro de fluorescencia. Se entiende además que los métodos de obtención de imágenes celulares pueden proporcionar además disposición espacial y análisis dinámicos de tales cualidades dentro de un espécimen o de una muestra que está analizándose.

También se describe pero no se reivindica un sistema de detección para su uso en un método según el tercer o cuarto aspecto de la invención, incluyendo el sistema:

una o más fuentes de radiación electromagnética para excitar fluorocromos y compuestos de emisión de luz usados en el método;

una pluralidad de detectores para detectar propiedades espectroscópicas asociadas con la absorción de radiación electromagnética mediante los fluorocromos y compuestos de emisión de luz; y

un sistema de análisis de detector adaptado para correlacionar las propiedades espectroscópicas detectadas con la presencia de células intactas y no intactas para discriminar de ese modo entre células intactas y no intactas.

Preferiblemente, los detectores son detectores de fluorescencia.

Muy ventajosamente, el sistema de detección puede tener una única fuente de radiación electromagnética para excitar conjuntamente los fluorocromos y compuestos de emisión de luz.

Muy ventajosamente, la pluralidad de detectores está en forma de un par de detectores que detectan las propiedades espectroscópicas de todos los fluorocromos y compuestos de emisión de luz.

La invención puede aplicarse a la investigación de integridad celular en una diversa variedad de aplicaciones y tipos de células. Cuando se hace mención en el presente documento a una célula o tipo de célula, se prefiere que la

célula o tipo de célula sea una célula eucariota viva. La invención puede usarse junto con todos los tipos de células. Las células pueden seleccionarse sin limitación de los siguientes tipos de células:

Células animales incluyendo células humanas y de mamíferos derivadas como especímenes de biopsia (por ejemplo, mediante aspirados de aguja fina), como explantes tisulares, como cultivos primarios (por ejemplo, fibroblastos de piel humana), como líneas celulares transformadas (por ejemplo, fibroblastos transformados SV40), como líneas celulares inmortalizadas (por ejemplo, líneas celulares inmortalizadas con telomerasa transcriptasa inversa humana [hTERT]), o como líneas de células tumorales establecidas.

Células de plantas y células bacterianas.

Líneas de células tumorales humanas incluyendo aquellas que representan sitios específicos y enfermedades de interés terapéutico, diagnóstico y analítico, preferiblemente aquellas que pueden demostrar crecimiento adherente sobre un sustrato, por ejemplo: cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (célula renal), leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de piel (no melanoma), cáncer tiroideo. Además, líneas de células tumorales humanas disponibles rutinariamente con fines de metodologías de selección de fármaco tales como las indicadas en el panel de líneas de células tumorales NCI-60 del Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (ref: http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common_files/cell_list.html):

Línea celular	Nombre de panel NCI-60	Línea celular	Nombre de panel NCI-60
A549/ATCC	Pulmón de células no pequeñas	786-0	Renal
EKVX	Pulmón de células no pequeñas	A498	Renal
HOP-62	Pulmón de células no pequeñas	ACHN	Renal
HOP-92	Pulmón de células no pequeñas	CAKI-1	Renal
NCI-H226	Pulmón de células no pequeñas	RXF 393	Renal
NCI-H23	Pulmón de células no pequeñas	SN12C	Renal
NCI-H322M	Pulmón de células no pequeñas	TK-10	Renal
NCI-H460	Pulmón de células no pequeñas	UO-31	Renal
NCI-H522	Pulmón de células no pequeñas	PC-3	Próstata
COLO 205	Colon	DU-145	Próstata
HCC-2998	Colon	MCF7	Mama
HCT-116	Colon	MDA-MB-231/ATCC	Mama
HCT-15	Colon	HS 578T	Mama
HT29	Colon	MDA-MB-435	Mama
KM12	Colon	BT-549	Mama
SW-620	Colon	T-47D	Mama
SF-268	SNC	LXFL 529	Pulmón de células no pequeñas
SF-295	SNC	DMS 114	Pulmón de células pequeñas
SF-539	SNC	DLD-1	Colon
SNB-19	SNC	KM20L2	Colon
SNB-75	SNC	SNB-78	SNC
U251	SNC	XF 498	SNC
LOX IMVI	Melanoma	RPMI-7951	Melanoma
MALME-3M	Melanoma	M19-MEL	Melanoma
M14	Melanoma	RXF-631	Renal
SK-MEL-2	Melanoma	SN12K1	Renal
SK-MEL-28	Melanoma	MDA-MB-468	Mama

SK-MEL-5	Melanoma	
UACC-257	Melanoma	
UACC-62	Melanoma	
IGR-OV1	De ovario	
OVCAR-3	De ovario	
OVCAR-4	De ovario	
OVCAR-5	De ovario	
OVCAR-8	De ovario	
SK-OV-3	De ovario	

Líneas de células tumorales humanas seleccionadas por su expresión funcional de entidades moleculares específicas tales como transportadores de moléculas xenobióticas (por ejemplo, el transportador de fármaco ABCA3 que se expresa en líneas de cáncer de pulmón H522M, A549, y EKVX) y células tumorales humanas seleccionadas por su rendimiento conveniente en estudios de transferencia de genes (por ejemplo, células de osteosarcoma humano U2-OS).

Líneas de células de mamífero usadas en estudios genómicos funcionales (por ejemplo, línea de células murinas NIH 3T3)

Formas unicelulares de vertebrados (por ejemplo, componentes de embriones, formas larvarias o células derivadas de preparaciones de células disociadas de pez cebra Danio [Brachydanio] rerio).

Líneas celulares usadas en protocolos de selección ADME/Tox (Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación/Toxicidad) (por ejemplo, líneas celulares derivadas de hepatocitos tales como HepG2).

Células madre embrionarias derivadas de fuentes humanas o murinas.

Células madre adultas

Neuronas y/o células de soporte del sistema nervioso central (por ejemplo astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células Schwann).

Híbridos de células somáticas inmortales incluyendo híbridos que segregan anticuerpos (por ejemplo, hibridomas).

Células madre frente a células no madre

Componentes de la sangre de células nucleadas

Células senescentes, no senescentes, adherentes, no adherentes, quiescentes y no quiescentes.

Pueden seleccionarse aplicaciones sin limitación a partir de las siguientes áreas de investigación:

Cambios en la integridad celular debido a cambios fisiológicos en las células (por ejemplo, diferenciación o cambio en la fase de crecimiento).

Cambios en la integridad celular debido a cambios en las células en respuesta a un proceso de enfermedad.

Cambios en la integridad celular inducidos por agentes infecciosos incluyendo bacterias y virus.

Cambios en la integridad celular inducidos por un parásito.

Cambios en la integridad celular debido a cambios en las células en respuesta a un agente físico (por ejemplo, radiaciones ionizantes y no ionizantes).

Cambios en la integridad celular debido a la incorporación de agentes físicos ópticos activos (por ejemplo, nanopartículas que portan pocillos cuánticos) o colorantes cromáticos.

Cambios en la integridad celular debido a cambios en las células en respuesta a un agente bioactivo conocido o desconocido con fines de:

Cambios en la integridad celular como monitor para la detección ambiental de toxinas (por ejemplo, contaminación por metales pesados).

Cambios en la integridad celular de toxicidad de nanopartículas con la ventaja de que las células que portan una carga tóxica de partículas pueden ubicarse conjuntamente con colorantes fluorescentes para análisis definitivo usando microscopía electrónica u otros enfoques de obtención de imágenes de alta resolución.

Cambios en la integridad celular para la detección de toxinas (por ejemplo, detección de endotoxinas para bioseguridad).

Cambios en la integridad celular para la detección de agentes tóxicos o perjudiciales con fines de monitorización de la seguridad y diagnóstico rápido.

Cambios en la integridad celular para la monitorización del progreso de un proceso de fermentación (por ejemplo, ciclo de vida de las levaduras en una aplicación de elaboración de cerveza).

Cambios en la integridad celular para la monitorización del progreso de un proceso de preparación biofarmacéutica (por ejemplo, producción de citocinas).

Cambios en la integridad celular para discernir transiciones de estado asociadas con muerte celular (apoptosis o necrosis).

Cambios en la integridad celular para el análisis de la progresión del ciclo celular en sistemas fisiológicos y patológicos.

Análisis de respuestas farmacodinámicas con fines de descubrimiento o selección de fármacos.

Cambios en la integridad celular para el estudio de sistemas celulares que modulan la estructura y función celular según experimentan cambios de estado bajo la influencia de programas internos o aplicados por agentes perturbantes (por ejemplo, citoesqueleto o agentes de modulación de cromatina).

Referencias citadas:

Biggerstaff, J. P., M. Le Puil, *et al.* (2006). “New methodology for viability testing in environmental samples.” Mol Cell Probes 20(2): 141-6.

Darzynkiewicz, Z., G. Juan, *et al.* (1997). “Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).” Cytometry 27(1): 1-20.

Erenpreisa, J., T. Freivalds, *et al.* (1997). “Apoptotic cell nuclei favour aggregation and fluorescence quenching of DNA dyes.” Histochem Cell Biol 108(1): 67-75.

Giao, M. S., S. A. Wilks, *et al.* (2009). “Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable Legionella pneumophila.” Microb Ecol 58(1): 56-62.

Lehtinen, J., J. Nuutila, *et al.* (2004). “Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability.” Cytometry A 60(2): 165-72.

Shenkin, M., R. Babu, *et al.* (2007). “Accurate assessment of cell count and viability with a flow cytometer.” Cytometry B Clin Cytom 72(5): 427-32.

Wlodkowic, D. y J. Skommer (2007a). “SYTO probes: markers of apoptotic cell demise.” Curr Protoc Cytom Chapter 7: Unit7 33.

Wlodkowic, D., J. Skommer, *et al.* (2007b). “Towards an understanding of apoptosis detection by SYTO dyes.” Cytometry A 71(2): 61-72.

Aunque la invención se ha descrito anteriormente, se entiende a cualquier combinación de la invención de las características establecidas anteriormente, o en la descripción, dibujos o reivindicaciones siguientes. Por ejemplo, pueden incorporarse elementos de un aspecto de la invención con elementos de otro aspecto de la invención.

Ahora se describirán realizaciones de compuestos, complejos fluorescentes, métodos y sistemas de detección según la invención con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:-

la figura 1 es un diagrama de espectros de excitación y fluorescencia para (a) varios colorantes (b) compuesto de fórmula (IIA) (c) un compuesto de fórmula (IA);

la figura 2 es un diagrama de fluorescencia obtenido usando una combinación de colorantes permeantes a las células e impermeantes a las células de la invención junto con (a) células vivas y (b) células muertas;

la figura 3 es un diagrama de espectros de fluorescencia para diversas combinaciones de colorante de múltiples colores basándose en una combinación de colorante permeante a las células/impermeante a las células de la invención, en particular (a) muestra un esquema de detección de dos colores, tres parámetros en células vivas (b) muestra un esquema de detección de dos colores, tres parámetros para células muertas y (c) muestra un esquema de detección de múltiples colores;

la figura 4 es un diagrama de fluorescencia obtenido a partir de un sistema de detección usando una combinación del compuesto de fórmula (IA) y anexina V;

la figura 5 es un diagrama de fluorescencia obtenido por medio de un sistema de detección usando una combinación de colorante del compuesto de fórmula (IA)/compuesto (IIA);

la figura 6 es un diagrama de fluorescencia obtenido a partir de un sistema de detección de tres fluorocromos de dos colores;

la figura 7 es un diagrama de fluorescencia obtenido a partir de un sistema de detección de cuatro fluorocromos de tres colores;

la figura 8 muestra espectros de absorbancia y emisión para un compuesto de fórmula (IA);

la figura 9 muestra fluorescencia obtenida a partir de experimentos usando anexina V-FITC en combinación con (a) yoduro de propidio (PI) con intensidad de fluorescencia de PI en una escala logarítmica (b) un compuesto de fórmula (IA), con intensidad de fluorescencia del compuesto de fórmula (IA) mostrada en una escala lineal (c) un compuesto de fórmula (IA), con un intensidad de fluorescencia del compuesto de fórmula (IA) mostrada en una escala logarítmica;

la figura 10 muestra tinción nuclear prominente de células de osteosarcoma humano U-2 OS fijadas usando un compuesto de fórmula (IA);

la figura 11 muestra la tinción de células con membranas comprometidas usando un compuesto de fórmula (IA);

la figura 12 muestra el efecto de incubación de células de linfoma de células B humanas que revela baja toxicidad de un compuesto de fórmula (IA);

la figura 13 muestra muerte celular de fase temprana y la correspondiente pérdida en la integridad de la membrana mitocondrial y plasmática en muerte de células Jurkat humanas en respuesta a estaurosporina; y

la figura 14 muestra el seguimiento de combinación del estado celular con sondas fluorescentes codirigidas a compuesto (IA) (células muertas) y compuesto (IIA) (células vivas).

La invención proporciona medios para etiquetar células vivas y células muertas usando una combinación de un colorante permeante y un colorante impermeante. Esta combinación de colorantes puede ser sustancialmente exclusiva mutuamente, en el sentido de que la detección del colorante permeante puede asociarse con la presencia de células vivas, y la detección del colorante impermeante a las células puede asociarse con la presencia de células muertas. Este principio se muestra en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Marcaje positivo de células vivas/muertas mediante detección de colorantes permeantes a las células/impermeantes a las células.

Estado celular	Colorante $B^{permeante}$	Colorante $A^{no\ permeante}$
viva	+	-
muerta	-	+

Por tanto, la invención proporciona la capacidad de asociar una célula viva con fluorescencia del colorante permeante a las células, y asociar una célula muerta con fluorescencia del colorante impermeante a las células, puesto que hay poco o nada de interferencia “de cruce de canal” entre los colorantes. Se apreciará que esto proporciona la oportunidad de realizar numerosos experimentos de dos fluorocromos, de dos colores, ventajosos. Además, los presentes inventores se han dado cuenta de que las combinaciones de colorante de este tipo también proporcionan una plataforma para realizar una variedad de experimentos ventajosos usando uno o más fluorocromos. La tabla 2 muestra sin limitación ejemplos de sistemas de detección de este tipo con referencia a la

combinación específica de colorante permeante a las células/impermeante a las células del compuesto de fórmula (IIA)/compuesto de fórmula (IA).

Tabla 2. Ejemplos de sondas fluorescentes que pueden usarse con una combinación de colorante permeante a las células/impermeante a las células y patrones de tinción positivos o negativos predichos.

Estado celular determinado por un análisis de compuesto (IA) combinado con un compuesto de fórmula (IIA)	Patrones de tinción de combinación		Inclusión de fluoros con propiedades espectrales solapantes		Inclusión de fluoros con diferentes propiedades espectrales	
	Tinción del compuesto de fórmula (IIA) (a 530 nm) g	Tinción de compuesto (IA) Rojo lejano (a >695 nm)	Sonda roja para un analito en células intactas (por ejemplo, célula marcada con nanopartícula Qdot que emite a 705 nm)	Sonda naranja para un analito en células no intactas (por ejemplo, un anticuerpo etiquetado con colorante Alexa 568 para una característica de membrana celular alterada)	Sonda verde para células intactas (por ejemplo, anexina V-FITC)	Otros fluoros espectralmente distintos para el análisis, por ejemplo de analitos de la superficie celular
Tinte de células vivas	+	-	+	-	+ o -	+ o -
Tinte de células muertas	-	+	-	+	+ o-	+ o-

Estos posibles sistemas de detección y otros se describirán ahora en más detalle con referencia a las figuras 1 a 9. La figura 1 muestra en términos generales (es decir, mediante diagrama) los espectros de excitación y fluorescencia del compuesto de fórmula (IIA) (B) (Ex/Em pico a 518/615 nm), y un compuesto de fórmula (IA) (A) (Ex/Em pico a 620/660 nm). Por tanto, la fluorescencia del compuesto de fórmula (IIA) está generalmente en la porción del naranja del espectro visible, mientras que la fluorescencia del compuesto (IA) está generalmente en la porción del rojo lejano del espectro visible. La figura 1b muestra el espectro de fluorescencia del compuesto de fórmula (IIA) solo. El compuesto de fórmula (IIA) es un colorante permeante a las células, y por tanto se esperaría que la firma de fluorescencia B estuviera en relación con células vivas o muertas. La figura 1c muestra la firma de fluorescencia A del compuesto (IA) solo. El compuesto (IA) es un colorante impermeante a las células, y por tanto la firma de fluorescencia A sólo se observaría en relación con células muertas o moribundas y no células vivas. La figura 2a muestra la fluorescencia obtenida cuando se usa una determinada combinación de un colorante permeante a las células (tal como un compuesto de fórmula (IIA)) y un colorante impermeante a las células (tal como compuesto (IA)) junto con células vivas. Como quizás se esperaba, sólo es la firma de fluorescencia B asociada con el colorante permeante a las células que se observa. La figura 2b muestra un efecto completamente sorprendente proporcionado por la presente invención cuando se usan determinadas combinaciones de colorantes permeantes/impermeantes a las células tales como las combinaciones del compuesto de fórmula (IIA)/compuesto (IA). Podría esperarse que una contribución significativa de la fluorescencia observada emanara del colorante del compuesto de fórmula (IIA). Sin embargo, se ha encontrado que con células muertas, se observa poca o ninguna fluorescencia del colorante del compuesto de fórmula (IIA). Más bien, toda o prácticamente toda la fluorescencia observada se debe a la señal de colorante impermeante a las células, compuesto (IA). Por tanto, el colorante de compuesto (IA) parece extinguir la señal del compuesto de fórmula (IIA). Muy sorprendentemente, esta extinción de la señal del compuesto de fórmula (IIA) parece ocurrir a través de toda la célula, y no sólo en el núcleo celular. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se cree que el sorprendente efecto de extinción proporcionado por la invención puede deberse a que el colorante impermeante a las células que tiene una afinidad de unión por ácido nucleico, y, posiblemente, otro material macromolecular en las células muertas, que es mayor que la del colorante impermeante a las células. Sin embargo, otros mecanismos pueden desempeñar un papel. El resultado es que es posible proporcionar un sistema de “semáforo” para indicar el estado de una célula, en el que la fluorescencia en una región espectral A se asocia con células muertas, y la fluorescencia en otra región espectral B se asocia con células vivas.

Una consecuencia útil de este sistema es que es posible proporcionar un tercer canal de detección usando detección de dos colores en las regiones espectrales A y B. La figura 3 muestra algunos ejemplos de cómo un sistema de detección de dos colores, tres canales puede proporcionarse con referencia a la combinación específica de colorante permeante a las células/impermeante a las células del compuesto de fórmula (IIA)/compuesto (IA). La figura 3a muestra fluorescencia detectada en células vivas usando los intervalos espectrales A y B. La fluorescencia en el intervalo B se asocia con emisión del compuesto de fórmula (IIA) como antes. En este esquema, se usa el compuesto de fórmula (IIA) en combinación con el compuesto (IA) y un colorante rojo o agente de emisión de luz adicional asociado preferiblemente con células intactas tales como nanocristales Qdot que emiten a 705 nm. Este sistema explota el hecho de que las células que proporcionan una señal positiva del compuesto de fórmula (IIA) no

presentan una señal en el rojo debido al compuesto (IA), y pueden identificarse positivamente como células vivas. La invención comprende que las células vivas que se han “etiquetado” de esta manera mediante la fluorescencia del compuesto de fórmula (IIA) en el naranja tienen un canal de detección potencial en la región roja A que está libre de interferencia de la emisión de compuesto (IA). La figura 3b representa un esquema de detección que explota la existencia de un canal de detección potencial en células muertas en la región naranja B que está sustancialmente libre de interferencia de fluorescencia del compuesto de fórmula (IIA). Tal como se muestra en la figura 3b, la presencia de fluorescencia del compuesto (IA) en la región espectral roja A “etiqueta” eficazmente una célula como una célula muerta. Si se usa un segundo colorante naranja, entonces puede obtenerse un espectro de fluorescencia tal como el que se muestra en la figura 3b, en el que puede usarse el segundo colorante naranja para proporcionar información adicional sobre células muertas. Es extremadamente conveniente usar sistemas de detección de dos colores, tres fluorocromos de este tipo, puesto que puede extraerse una gran cantidad de información usando un sistema de detección relativamente simple. Sin embargo, la invención incluye el uso de combinaciones de colorante de múltiples colores que usan fluorescencia en más de dos regiones del espectro electromagnético. La figura 3c representa un esquema de fluorescencia de colorante de múltiples colores generalizado, en el que se usan uno o más colorantes que fluorescen en regiones espectrales que difieren de las regiones espectrales A y B.

La figura 4 muestra los resultados que pueden obtenerse a partir de un sistema de detección que usa compuesto (IA) en combinación con un ensayo de anexina V tal como anexina V-FITC que fluoresce en la región espectral verde. Esta combinación de colorantes proporciona discriminación mejorada de las fases de muerte celular vinculada con apoptosis. Tal como se muestra en la figura 4, una señal de compuesto (IA) baja/anexina baja es indicadora de células normales. Las células apoptóticas se indican mediante una señal de anexina V aumentada en combinación con una baja señal de compuesto (IA). La aparición de muerte celular se indica mediante la presencia de tanto una alta señal de anexina V y una señal de compuesto (IA) restringida. Se proporciona discriminación adicional mediante un canal que comprende una baja señal de anexina V y una alta señal de compuesto (IA) que es indicadora de residuo celular.

La figura 5 es un gráfico del mismo tipo general que el mostrado en la figura 4, que en este caso muestra intensidad de fluorescencia en un sistema de detección que usa la combinación de colorante del compuesto de fórmula (IIA)/compuesto (IA). De nuevo, se observa un nivel de la discriminación en el avance de células hasta muerte celular. Más específicamente, cuando se notifica una baja señal de fluorescencia de compuesto (IA), pueden identificarse tres “canales” distintos. Una señal positiva en el naranja para el compuesto de fórmula (IIA) en combinación con una baja señal de compuesto (IA) es indicadora de células normales, mientras que una señal del compuesto de fórmula (IIA) mejorada es indicadora de células detenidas. Obsérvese que una señal negativa para tanto el compuesto (IA) como el compuesto de fórmula (IIA) es indicadora de residuo celular. Una señal de compuesto (IA) positiva en combinación con una señal del compuesto de fórmula (IIA) negativa es indicadora de células muertas. El lector experto apreciará a partir de una consideración de la figura 5 que existen potencialmente dos canales adicionales disponibles, es decir, la combinación de una alta señal roja con o bien una alta señal naranja o bien una señal naranja mejorada. Puesto que la señal naranja alta o mejorada se asocia con la presencia de células vivas, no es posible obtener una alta señal de compuesto (IA) en combinación con estas señales naranjas. En su lugar, es posible usar un tercer fluorocromo que fluoresce en la región roja, tal como nanocristales Qdot que emiten a 705 nm, para proporcionar un sistema de análisis de tres fluorocromos, dos colores. Una ventaja con un sistema de este tipo es que puede usarse un único color láser para excitar los tres fluorocromos, por ejemplo, usando radiación de 488 nm de un láser de ion Ar.

La figura 6 es un gráfico del mismo tipo general que el mostrado en la figura 5, que representa un sistema de análisis de tres fluorocromos, de dos colores usando nanocristales Qdot que emiten a 705 nm en combinación con compuesto (IA) y compuesto de fórmula (IIA). Puede observarse que la fluorescencia en la región espectral roja de los nanocristales Qdot se observa en los dos canales que están disponibles debido a la ausencia de fluorescencia del compuesto (IA) de las células vivas.

La figura 7 muestra los resultados que pueden obtenerse a partir de un sistema de tres colores que se basa en la combinación de colorante permeante a las células/impermeante a las células del compuesto de fórmula (IIA)/compuesto (IA). En esta realización, se usa un tercer fluorocromo tal como nanocristales Qdot que emiten a 705 nm que fluorescen en la región roja del espectro con el fin de sondear células vivas que se han etiquetado positivamente mediante la detección de fluorescencia del compuesto de fórmula (IIA). Además, también se usa un cuarto fluorocromo tal como anexina V-FITC, realizándose la detección en la región verde del espectro. Esta disposición de detección puede caracterizarse como una técnica de análisis de cuatro fluorocromos, de tres colores, dos láser. Tal como se muestra en la figura 7, el resultado que puede obtenerse a partir de un sistema de este tipo puede presentarse usando un sistema de tres ejes para representar la fluorescencia obtenida en los intervalos de tres colores. Por tanto, los resultados obtenidos pueden entenderse en cuanto a un volumen de datos tridimensional, que proporciona un nivel de discriminación mejorado en el avance de células desde el estado normal hasta apoptosis y muerte celular. En particular, la combinación de baja señal de compuesto (IA), señal del compuesto de fórmula (IIA) mejorada y alta señal de anexina V-FITC es indicadora de células que están tanto detenidas como apoptóticas, mientras que la combinación de alta señal de compuesto (IA), baja señal del compuesto de fórmula (IIA) y alta señal de anexina V-FITC es indicadora de células muertas. Puede observarse que este sistema puede proporcionar mucha información sobre los procesos celulares. Debe indicarse que todas las células están presentes

en el volumen de detección representado en la figura 7. Puede realizarse un análisis de múltiples colores con el fin de interpretar los resultados. Pueden usarse otras combinaciones de fluorocromos con el fin de proporcionar niveles de discriminación e información diferentes o adicionales. En principio, aún pueden usarse fluorocromos adicionales con el fin de proporcionar información adicional. Un fluorocromo adicional puede fluorescer en un espectro o región diferentes para proporcionar un canal de color adicional o, posiblemente, puede usarse un fluorocromo que fluoresce en las regiones espectrales naranja o verde siempre que las características de detección de un fluorocromo adicional de este tipo no interfieran con los canales de detección del compuesto de fórmula (IIA) o anexina V-FITC. Pueden usarse colorantes verdes y/o cian con el fin de seguir los procesos de cambio celular.

EJEMPLO 1. Síntesis del compuesto de fórmula (IIA) [1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona] y un compuesto de fórmula (IB) [yoduro de 1,5-bis{N-[2-(trimetilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona]

Se sintetizó 1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona según el ejemplo 1 del documento WO99/65992. Se añadió cloroformo (2 ml) a 1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}antraceno-9,10-diona (58 mg, 0,152 mmol). A la disolución morado oscuro se le añadió MeCN (1 ml) seguido por yoduro de metilo (95 µl 1,524 mmol). Tras agitar durante 10 min, se forma un precipitado. Tras agitar durante 4 h, se evaporaron los volátiles. Se trituró el residuo a partir de cloroformo (5 ml), se recogió mediante filtración se lavó con diclorometano (20 ml) y dietil éter (10 ml). Se aisló un sólido rosa oscuro (0,09 g, 0,135 mmol, 89% de rendimiento). ^{1}H-RMN (400MHz, d_6-DMSO) δ: 9,69 (2H, t), 7,72 (2H, dd), 7,52 (2H, dd), 7,30 (2H, dd), 3,91 (4H, q), 3,62 (4H, t), 3,18 (18H, s)

EJEMPLO 2. Síntesis un compuesto de fórmula (IA) [yoduro de 1,5-bis{[2-(trimetilamino)etil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona]

Se sintetizó 1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona según el ejemplo 1 del documento WO99/65992. Se añadió cloroformo (2 ml) a 1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}-5,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona (44 mg, 0,107 mmol). A la disolución morado oscuro se le añadió MeCN (2 ml) seguido por yoduro de metilo (66,6 µl, 1,067 mmol). Tras agitar durante 1 min se forma un precipitado. Tras agitar durante 4 h, se evaporaron los volátiles. Se trituró el residuo a partir de cloroformo (5 ml), se recogió mediante filtración se lavó con diclorometano (20 ml) y dietil éter (10 ml). Se aisló un sólido azul oscuro. Rendimiento = 173-012 (0,05 g, 0,068 mmol, 63,9% de rendimiento) ^{1}H-RMN (400MHz, d_6-DMSO) δ: 13,97 (2H, s), 9,77 (2H, a t), 7,49 (2H, d), 7,40 (2H, d), 3,96 (4H, a q), 4,09 (4H, t), 3,19 (18H, s).

EJEMPLO 3. Propiedades espectrales del compuesto (IA)

Se sintetizó el compuesto (IA) usando los principios descritos en el ejemplo 2 y se almacenó a +4ºC como una disolución madre de dilución de compuesto (IA) 5 mM en tampón. Se obtuvieron espectros de absorbancia usando un espectrómetro y una disolución 20 µM de agente disuelto en PBS y se midió en una cubeta de sílice y cuarzo de 1 cm de recorrido. Se determinaron espectros de fluorescencia para una disolución de compuesto (IA) 20 µM en una cubeta semi-micro de cuarzo de 1 cm de longitud de recorrido mediante excitación a 633, 589, 534, 488 nm. Se realizaron mediciones de fluorescencia en un espectrofluorómetro LS50 de Perkin Elmer con anchuras de ranura ajustadas a 10 nm. Se equipó el espectrofluorómetro con un tubo fotomultiplicador sensible al rojo (tipo R928; Hamamatsu Photonics KK, Japón). Se acumularon datos y se exportaron a una hoja de cálculo para corregir el control de tampón y determinar la emisión máxima. Los resultados se muestran en la figura 8. El compuesto (IA) puede excitarse subóptimamente mediante longitudes de onda desde 488 nm (en citometría de flujo) y hasta 647 nm (ExAmax 646 nm). Normalmente, para la obtención de imágenes celulares, la excitación se realiza con longitudes de onda o bien de 633 nm o bien 647 nm. Los espectros de emisión son independientes de la longitud de onda de excitación, es decir, todos los espectros de emisión son idénticos independientemente de la longitud de onda de excitación.

EJEMPLO 4. Aplicación de propiedades impermeantes celulares del compuesto (IA) en la distinción entre células vivas y muertas en un ensayo de anexina V para la inducción de muerte celular

Este ejemplo se refiere a la muerte celular en fases posteriores asociada con la translocación de moléculas de fosfatidilserina del estrato interno (citoplasmático) de la membrana plasmática en células de linfoma de células B humanas (DoHH2) que se han expuesto a un fármaco citotóxico (VP-16). La detección de la inducción de apoptosis dependiente de la dosis se realizó usando citometría de flujo.

Se ha buscado demostrar la aplicación del compuesto (IA) como un marcador de viabilidad celular que determina la fracción no viable debido a permeabilidad mejorada de la membrana celular como resultado de apoptosis inducida con un etopósido (VP-16) incluyendo las ventajas espectrales de usar una sonda fluorescente de color rojo oscuro de la de otros fluorocromos comúnmente usados mediante el uso de excitación selectiva.

El compuesto IA pudo detectar con similar exactitud que el yoduro de propidio la fracción no viable. Esta fracción

mostró un aumento dependiente de la dosis tras dosis aumentadas de etopósido. Se realizaron tomas temporalizadas para optimizar el marcaje del compuesto (IA). También se realizó modificación de la dosis para determinar la concentración óptima de compuesto (IA).

Reactivos

Se proporcionó VP-16 (VP-16-213; VEPESID; etopósido) como una disolución madre 34 mM (Bristol Meyers Pharmaceuticals, Syracuse, NY) y se almacenó a 4ºC. Se adquirió anexina V conjugada con fluoresceína (anexina V-FITC) de Pharmingen (Becton Dickinson UK, Oxford, R.U.). Se obtuvo yoduro de propidio (PI) como una disolución 1 mg/ml en H_2O (Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos). Se formuló el compuesto (IA) en agua como una disolución 5 mM y se almacenó a 4ºC.

Cultivo celular y tratamiento farmacológico: Se usaron las líneas celulares de linfoma B folicular humano en este estudio. DoHH2 fue un obsequio de Dr JC Kluin-Nelemans [Leiden, Países Bajos]. Se mantuvo rutinariamente DoHH2 en RPMI 1640 complementado con FCS al 5% y penicilina 100 U ml-1, estreptomicina 100 μg ml-1, y glutamina 2 mM. Se pasaron las células dos veces a la semana a una densidad de inicio de 5 ×104 células ml-1 cultivadas a 37ºC en una atmósfera humidificada del 5% de CO_2/el 95% de aire. Se expusieron las células a una variedad de dosis de VP-16 (0-2,5 μM) para inducir apoptosis [Paul J. Smith, Marie Wiltshire, Sharon Davies, Suet-Feung Chin, Anthony K. Campbell, y Rachel J. Errington (2002). DNA damage-induced [Zn2+]i transients: correlation with cell cycle arrest and apoptosis in lymphoma cells. Am J Physiol Cell Physiol 283 (2): 609-622]. Se cultivaron células Jurkat humanas de manera similar.

Preparación de muestra para marcaje con anexina-V: Se prepararon las muestras para la detección de la unión superficial de anexina V-FITC a células que experimentan cambios apoptóticos y se tiñeron conjuntamente con PI o el compuesto (IA) para detectar pérdida de integridad de la membrana plasmática. Se prepararon las muestras según Vermes *et al.* En resumen, se lavaron muestras de células (4x 10^5 células/ml) con PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión 1X (Hepes/NaOH 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM) a una concentración de 2 x 10^5 células/ml. Se transfirieron 100 μl de esta disolución a un tubo de flujo de fondo redondo de poliestireno (Falcon) por muestra al que se le añadieron 5 μl de anexina V-FITC y 10 μl de PI (disolución madre 50 μg/ml) según se requiriese. Se trataron de manera simulada las muestras de control según fuera necesario. Se giraron suavemente en vórtex las muestras, luego se incubaron en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadieron 400 μl de tampón de unión 1X a cada tubo y se mantuvieron las muestras en hielo durante un máximo de 1 hora antes del análisis mediante citometría de flujo.

Citometría de flujo: Se usó un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA) equipado con un láser de ion argón Enterprise II de Coherent que tenía 488 nm y salidas UV multilínea (351-355 nm) (Coherent, Inc., Santa Clara, CA). Se reguló la potencia del láser Enterprise II a 30 mW (se monitorizó en una salida de UV multilínea) se usó software CELLQuest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) para adquisición y análisis de señales. Se adquirieron dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) en modo lineal. Se detectaron señales fluorescentes de FITC y PI derivadas de la excitación a 488 nm en modo logarítmico a emisiones de detección de fotomultiplicadores seleccionadas espectralmente por filtros ópticos; se detectó la señal del compuesto (IA) derivada de la excitación a 488 nm en modo logarítmico o lineal pero también pudo detectarse tras la excitación a 633 nm usando un tercer láser incorporado de manera conveniente en el sistema óptico. Se detectó la señal del compuesto de fórmula (IIA) derivada de la excitación a 488 nm tanto en modo logarítmico como lineal. Se recogieron las señales para dispersión frontal y lateral y fluorescencia para 10.000 células usando el parámetro de dispersión de luz frontal como señal maestra. Se modificaron el análisis por pulso de señales de fluorescencia y las configuraciones de compensación de fluorescencia para mejorar el reconocimiento de subconjuntos celulares en combinaciones multifluoro tal como se entiende fácilmente en la técnica. Se expresan los datos como valores de intensidad de fluorescencia media (FI) y se muestran en la figura 9.

EJEMPLO 5. Tinción nuclear prominente de células de osteosarcoma humano U-2 OS fijadas mediante un compuesto de fórmula (IA) detectado mediante microscopía de fluorescencia.

Se ha buscado la propiedad del compuesto (IA) para seleccionar eficazmente como ADN nuclear diana.

Cultivo celular: se cultivaron células de osteosarcoma humano U-2 OS (ATCC HTB-96) (adherentes) en medio McCoy 5a complementado con suero bovino fetal al 10% (FCS), glutamina 1 mM, y antibióticos y se incubaron a 37ºC en una atmósfera del 5% CO_2 en aire. Para experimentos de obtención de imágenes de fluorescencia, se hiceron crecer células a una densidad de 1x10^5 células ml^{-1} como una monocapa en cámaras con fondo de recubrimiento vítreo (Nunc, 2 Well Lab-Tek II, Fisher Scientific).

Obtención de imágenes: tras un periodo de 24 horas, se fijaron entonces las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15-30 min a temperatura ambiente. No se requiere etapa de lavado. Se usó el compuesto (IA) de manera apropiada para ser el procedimiento de tinción final, tras cualquier tratamiento. Se añadió el compuesto (IA) directamente a 20 μM en una capa de PBS de 0,5 ml de las células adherentes. Se observaron las células

directamente usando microscopía de fluorescencia de campo amplio. Se colocaron las cámaras en un microscopio Axiovert 100 (Carl Zeiss, Welwyn Garden City, R.U. y usando una lente apocromática de inmersión en aceite 40x, 1,3 NA). Se capturaron imágenes de fluorescencia (Ex: 620/60 nm; Em 700/75 nm) nm usando una cámara ORCA-ER CCD (Hamamatsu, Reading, R.U.) y software de adquisición MetaMorph (MDS, EE.UU.). Las células mostraron la ubicación de altos niveles de compuesto (IA) en el núcleo. Se segmentaron la tinción de núcleos del compuesto (IA) usando un algoritmo umbral simple que representa los núcleos, y proporcionan información binaria o de máscara de cada ubicación de núcleo (objeto). Se muestra la ubicación nuclear del compuesto original (IA) tras la segmentación. Se muestran los resultados en la figura 10.

EJEMPLO 6. La tinción de células con membranas comprometidas mediante un compuesto de fórmula (IA) permite la identificación mediante tinción negativa de células intactas.

Este ejemplo muestra el análisis de inducción de muerte celular mediante estaurosporina en poblaciones de células Jurkat humanas analizadas mediante citometría de flujo. Se ha buscado demostrar la aplicación del compuesto (IA) como un marcador de viabilidad celular que determina la fracción no viable debido a permeabilidad mejorada de la membrana celular como resultado de muerte celular inducida con estaurosporina.

Cultivo celular y tratamiento farmacológico: se usó una línea de células Jurkat en este estudio. Se mantuvieron cultivos de células Jurkat rutinariamente en RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y penicilina 100 U ml-1, estreptomicina 100 µg ml-1, y glutamina 2 mM. Se pasaron las células dos veces a la semana a una densidad de inicio de 5×10^4 células ml^{-1} cultivadas a 37ºC en una atmósfera humidificada del 5% de CO_2/el 95% de aire. Se establecieron las células a $0{,}5x10^5$ células/ml, 5 ml por matraz. Se expusieron las células a estaurosporina 0 y 2 µM durante 24 horas en condiciones de cultivo convencionales para inducir muerte celular. Se añadió el compuesto (IA) (3 µM) de una disolución madre 5 mM a cada muestra y se analizó mediante citometría de flujo.

Citometría de flujo: Se usó un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA) equipado con un láser de ion argón Enterprise II de Coherent que tenía 488 nm y salidas UV multilínea (351-355 nm) (Coherent, Inc., Santa Clara, CA). Se reguló la potencia del láser Enterprise II a 30 mW (se monitorizó en la salida de UV multilínea) se usó software CELLQuest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) para adquisición y análisis de señales. Se adquirieron dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) en modo lineal. Se detectaron señales fluorescentes del compuesto (IA) derivadas de la excitación a 488 nm en modo logarítmico a FL3 695LP. Se recogieron señales y dispersión frontal y lateral y fluorescencia para 10.000 células usando el parámetro de dispersión de luz frontal como señal maestra. Se presentaron los datos como diagramas de contorno de la intensidad de fluorescencia (695LP) para el compuesto (IA) frente a la señal de dispersión frontal para indicar el tamaño celular. Se muestran los resultados en la figura 11.

EJEMPLO 7. El efecto de la incubación de células de linfoma de células B humanas (SU-DHL-4) con un compuesto de fórmula (IA) que revela la baja toxicidad del colorante impermeante a las células lo que indica una propiedad ventajosa para la incorporación en estudios de incubación de células vivas a largo plazo para la determinación del incremento de muerte celular asociada con un tratamiento dado.

Cultivo celular y tratamiento: se usaron líneas celulares de linfoma B folicular humano en este estudio. Se mantuvo SU-DHL-4 rutinariamente en RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y penicilina 100 U ml-1, estreptomicina 100 µg ml^{-1}, y glutamina 2 mM. Se pasaron las células dos veces a la semana a una densidad de inicio de 5×10^4 células ml^{-1} cultivadas a 37ºC en una atmósfera humidificada del 5% de CO_2/el 95% de aire. Se establecieron las células a $0{,}5x10^5$ células/ml a 5 ml por matraz. Se expuso continuamente cada cultivo a una de tres dosis del compuesto (IA) (0, 3 y 10 µM) durante 96 horas en condiciones de cultivo convencionales. En el momento (t) 0, 24, 48, 72 y 96 horas, se determinó la densidad celular mediante recuento de Coulter de muestras de 0,4 ml de cada matraz. Se presentan los datos como un aumento del número de células relativo (Nt/N0) (695LP) frente al tiempo (horas) para la concentración dada de compuesto (IA). Se muestran los resultados en la figura 12.

EJEMPLO 8. Fase temprana en muerte de células Jurkat humanas asociada con la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en respuesta al agente que induce apoptosis estaurosporina.

La incorporación de un colorante impermeante a las células preferido (compuesto de fórmula (IA)) en análisis de parámetros múltiples típicos usando otros reactivos fluorescentes con propiedades de interés en la notificación de la pérdida de integridad celular con las ventajas de co-incorporación en ensayos para proporcionar medios de distinción de células intactas y dañadas.

En este ejemplo, el colorante JC-1 (yoduro de 5,5',6, 6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazol-carbocianina) es un catión fluorescente lipofílico que se incorpora en la membrana mitocondrial, donde puede formar agregados debido al potencial de membrana de mantenimiento fisiológico de las mitocondrias. La agregación modifica las propiedades de fluorescencia de JC-1 lo que conduce a un desplazamiento desde fluorescencia verde hasta naranja. Se usó citometría de flujo u obtención de imágenes para monitorizar la disminución de la fluorescencia naranja y un aumento de la fluorescencia verde lo que permite que se distingan células apoptóticas de células no apoptóticas. En

este caso, la incorporación adicional del colorante impermeante a las células preferido con propiedades de fluorescencia rojas pero no naranjas permite la co-identificación de aquellas células que ya están en fases tardías de muerte celular asociada con pérdida de integridad de la membrana que proporciona una resolución más precisa de las fases de muerte celular no obtenible previamente.

Cultivo celular y tratamiento farmacológico: se usó una línea de células Jurkat en este estudio. Se mantuvieron cultivos de células Jurkat rutinariamente en RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y penicilina 100 U ml-1, estreptomicina 100 µg ml-1, y glutamina 2 mM. Se pasaron las células dos veces a la semana a una densidad de inicio de 5×10^4 células ml^{-1} cultivadas a 37ºC en una atmósfera humidificada del 5% de CO_2/el 95% de aire. Para el ensayo, se establecieron las células a $0{,}5x10^5$ células/ml, 1 ml por pocillo. Se expusieron las células a estaurosporina 0 (condiciones de control) y 1 µM durante 4 horas. Se lavaron las células y se expusieron a JC-1 (RPM). Se añadió el compuesto (IA) (3 µM) de una disolución madre 5 mM a cada muestra. Entonces estas se analizaron mediante citometría de flujo o se colocaron en un Nunc, 2 Well Lab-Tek II, (Fisher Scientific) y se analizaron mediante microscopía confocal de tres canales.

Citometría de flujo de parámetros múltiples de células tratadas con estaurosporina Un citómetro de flujo FACS Vantage (como por ejemplo anteriormente). Se adquirieron dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) en modo lineal. Se detectaron señales fluorescentes de dos parámetros JC-1 derivadas de la excitación a 488 nm en modo logarítmico. Se detectó el monómero J verde usando FL1 (emisión de 530/30 nm); se detectó el agregado J naranja usando FL2 (emisión de 585/42 nm). Se detectaron señales fluorescentes del compuesto (IA) derivadas de la excitación a 488 nm en modo logarítmico a FL3 a 695LP. Se recogieron señales para dispersión directa y lateral y fluorescencia para 10.000 células usando el parámetro de dispersión de luz frontal como señal maestra. Los resultados se muestran en la figura 13. (A-C). Se presentan los datos de JC-1 como diagramas de contorno de la intensidad de fluorescencia (585/42 nm) para agregados J frente a la intensidad de fluorescencia (530/30 nm) para el monómero J. Estos se segmentan adicionalmente para derivar las células con alto potencial de membrana mitocondrial (región superior) y células con bajo potencial mitocondrial (región inferior). Se representa simultáneamente la viabilidad celular en estas dos fracciones con el compuesto (IA). La región superior consiste en células predominantemente vivas y la región inferior consiste en células tanto no viables como vivas, la funcionalidad del compuesto (IA) puede representar estas subfracciones (apoptosis temprana (negativas para el compuesto (IA)) y apoptosis tardía (positivas y permeables para el compuesto (IA)).

Obtención de imágenes de parámetros múltiples de células tratadas con estaurosporina. La unidad de barrido era un sistema Radiance MP de BioRad (BioRad Microscience, Hemel Hempstead, R.U.) unido a un microscopio invertido Eclipse TE300 de Nikon, usando una lente de inmersión en aceite planapo 60x/1,4 NA. Se recogieron imágenes de de tres canales, tridimensionales (3D) (x,y,z) usando una configuración confocal (orificio cerrado). Se recogieron simultáneamente todos los canales verdes (monómero J, excitación a una emisión de 488 nm a 500-530 nm); naranjas (agregado J, excitación a una emisión de 488 nm a 590/70); y rojos (compuesto (IA)) (marcador de células no viables, excitación a una emisión de 637 nm a 660LP). Se procesó la secuencia de imágenes en 3D en imágenes de proyección máxima individuales, y los tres canales se presentaron como monómero J, agregado J y células de núcleo de ADN. Se muestran los resultados en la figura 13 (D).

Se ha buscado la explotación de aplicaciones de múltiples fluorocromos explotando el concepto de *extinción de la señal mediante competencia objetivo* entre el colorante impermeante a las células preferido y un segundo colorante permeante a las células preferido. La separación espectral proporciona señales exclusivas que surgen de sólo un colorante dentro de cualquier célula dada y, por tanto, permite integración simple en ensayos de múltiples fluorocromos con niveles mayores de análisis policrómaticos fácilmente comprensibles dentro del campo.

EJEMPLO 9. Seguimiento de combinación del estado celular. El marcaje de poblaciones celulares con el compuesto de fórmula (IA) más el compuesto (IIA) para demostrar el marcaje no conjunto de subpoblaciones en cultivos de DOHH2 tratados con VP-16 para derivar un ensayo que justifica células viables/detenidas (positivas para el compuesto (IIA)) y dañadas (positivas para el compuesto (IA)).

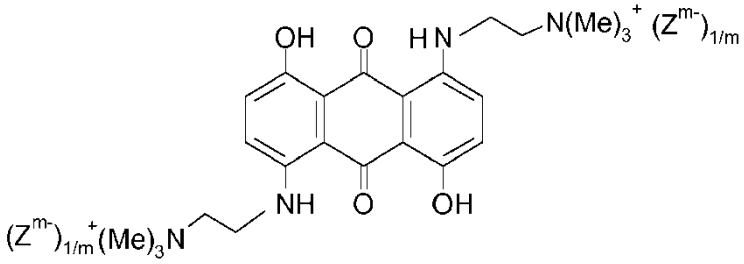
Cultivo celular y tratamiento farmacológico: se usó una línea de células de linfoma B folicular humano en este estudio. Se mantuvo DoHH2 rutinariamente en RPMI 1640 complementado con FCS al 5% y penicilina 100 U ml-1, estreptomicina 100 $\mu g ml^{-1}$, y glutamina 2 mM. Se pasaron las células dos veces a la semana a una densidad de inicio de 5×10^4 células ml^{-1} cultivadas a 37ºC en una atmósfera humidificada del 5% de CO_2/el 95% de aire. Se establecieron las células a 5×10^5 células/por ml y se expusieron a dosis de VP-16 (0,25 µM) para inducir apoptosis. Se añadieron el compuesto (IIA) 20 µM y el compuesto (IA) 4 µM a 1 ml de células y se incubaron en condiciones de cultivo convencionales durante 10 minutos. Se analizaron las muestras mediante citometría de flujo.

Se usó un citómetro de flujo FACS (como por ejemplo anteriormente). Se detectaron las señales fluorescentes del compuesto (IIA) y compuesto (IA) derivadas de la excitación a 488 nm en modo lineal a FL2 para el compuesto (IIA) (filtros de 585/42 nm); se detectó la señal del compuesto (IA) derivada de 488 nm en modo lineal a FL3 con un filtro 695LP y un SP dicroico FL1/2 560 nm SP para determinar las propiedades de dispersión. Se recogieron señales para la dispersión frontal y lateral y fluorescencia para 10.000 células usando el parámetro de dispersión de luz

frontal como señal maestra. Se expresan los datos como diagramas de contorno y se muestran en la figura 14. Los diagramas de contorno de dispersión lateral frente a frontal representan dos poblaciones de células. La adición del compuesto (IIA) y compuesto (IA) proporciona estado funcional de estos cultivos. En primer lugar, todas las células se contabilizan en el ensayo usando estos dos fluoróforos de selección como diana conjunta. El compuesto (IA) identifica la fracción de células no intactas, mientras que las células positivas para el compuesto (IIA) representan la fracción de células vivas (viables). Obsérvese que esta fracción viable tiene dos poblaciones que representan además un incremento de una población detenida (G2). Además, la fracción de compuesto (IIA) representaba una fracción única con mayores propiedades de dispersión frontal (es decir, tamaño celular), mientras que la población del compuesto (IA) presentó menores propiedades de dispersión frontal medias.

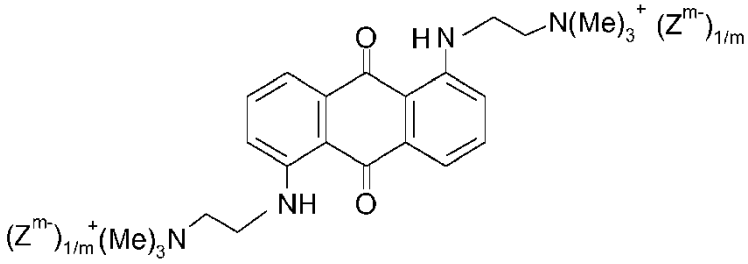
REIVINDICACIONES

1. Compuesto que es de fórmula (IA)



(IA);

o que es de fórmula (IB)



(IB)

en el que $(Z^{m-})_{1/m}$ es un anión de carga m.

2. Complejo fluorescente que incluye un ácido nucleico y un compuesto tal como se define en la reivindicación 1.

3. Método de análisis de una muestra de células u otro material biológico que contiene ácido nucleico que incluye las etapas de:

a) preparar una disolución biológicamente compatible que contiene un compuesto tal como se define en la reivindicación 1;

b) tratar una muestra de células u otro material biológico con la disolución biológicamente compatible; y

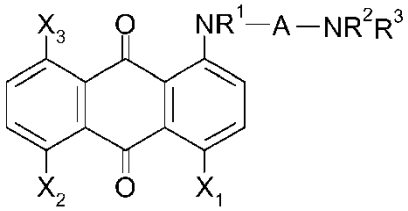
c) detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB).

4. Método según la reivindicación 3, en el que la etapa b) se realiza para teñir la muestra de células con el compuesto de fórmula (IA) o (IB).

5. Método según la reivindicación 4, en el que el incremento de muerte celular se monitoriza, en el que la etapa b) se realiza antes de o durante un periodo de ensayo permitiendo de ese modo una lectura continua o frecuente de incremento de muerte celular durante el periodo de ensayo.

6. Método según la reivindicación 5, para discriminar entre células intactas y no intactas, en el que el compuesto de fórmula (IA) o (IB) es impermeante a las células, la etapa b) incluye además tratar la muestra con un segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células, y la etapa c) incluye además detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz, en el que la detección de la propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el compuesto de fórmula (IA) o (IB) se correlaciona con la presencia de células no intactas, y la detección de la propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz se correlaciona con la presencia de células intactas.

7. Método según la reivindicación 6, en el que el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz es un compuesto de fórmula (II):



(II)

o un derivado N-óxido del mismo;

en el que: A es un grupo alquileno C_{2-8}; R^1, R^2 y R3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, dihidroxialquilo C_{2-4} en el que el átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno no porta un grupo hidroxilo y ningún átomo de carbono se sustituye con dos grupos hidroxilo, o R^2 y R^3 forman juntos un grupo alquileno C_{2-6} que con el átomo de nitrógeno al que R^2 y R^3 se unen forma un anillo heterocíclico; y

X_1, X_2 y X_3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, NR^1-A-NR^2R^3, halógeno-amino, alquiloxilo C_{1-4} o alcanoiloxilo C_{2-8}.

8. Método de discriminación entre células intactas y no intactas que incluye las etapas de:

a) preparar una disolución biológicamente compatible que contiene un compuesto tal como se define en la reivindicación 1;

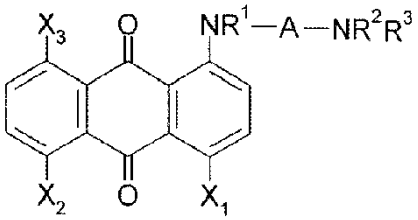
b) preparar una disolución biológicamente compatible que contiene un fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células que tiene un potencial de unión para ácido nucleico y/u otro material macromolecular en las células discriminadas que es menor que el del fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células, y como consecuencia compite menos eficazmente en presencia del fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células para unirse al ácido nucleico y/u otro material macromolecular en las células discriminadas de modo que el fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células se excluye sustancialmente de la unión a células no intactas o se enmascara por el fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células;

c) tratar una muestra de células con la disolución o disoluciones biológicamente compatibles; y

d) detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el fluorocromo o compuesto de emisión de luz impermeante a las células y correlacionarla con la presencia de células no intactas, y detectar una propiedad espectroscópica asociada con la absorción de radiación electromagnética mediante el fluorocromo o compuesto de emisión de luz permeante a las células y correlacionarla con la presencia de células intactas.

9. Composición que incluye una mezcla de un compuesto según la reivindicación 1, con al menos un segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz.

10. Composición según la reivindicación 9, en la que el segundo fluorocromo o compuesto de emisión de luz es de fórmula (II)



(II)

o un derivado N-óxido del mismo;

en el que

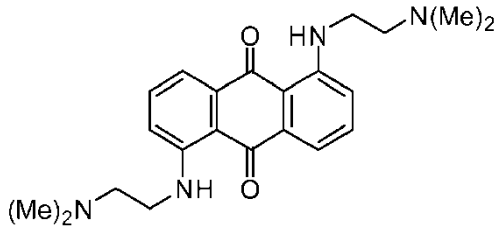
A es un grupo alquileno C_{2-8}; R^1, R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C_{1-4}, dihidroxialquilo C_{2-4} en el que el átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno no porta un grupo hidroxilo y

ningún átomo de carbono se sustituye con dos grupos hidroxilo, o R^2 y R^3 forman juntos un grupo alquileno C_{2-6} que con el átomo de nitrógeno al que R^2 y R^3 se unen forma un anillo heterocíclico; y

X_1, X_2, y X_3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, NR^1-A-NR^2R^3, halógeno-amino, alquiloxilo C_{1-4} o alcanoiloxilo C_{2-8}.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que en el compuesto de fórmula (II), X_2 es NR^1-A-NR^2R^3 pero X_1 y X_3 no lo son.

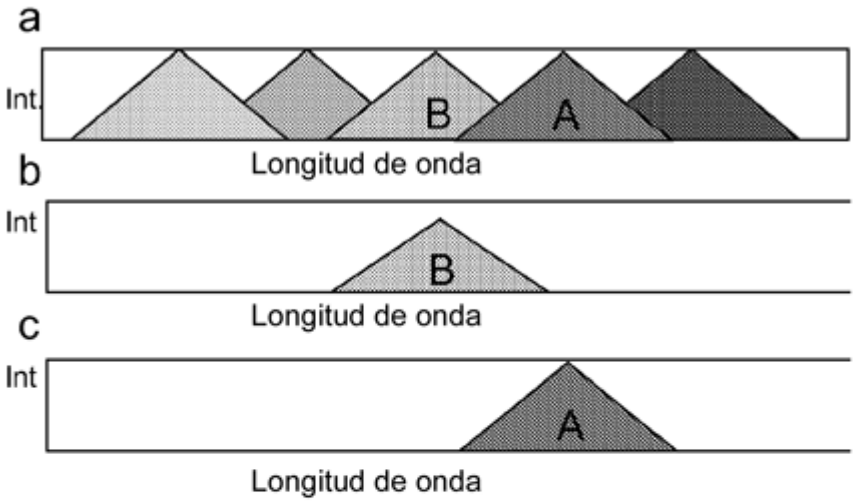
12. Composición según la reivindicación 11, en la que el compuesto de fórmula (II) es de fórmula (IIA)



(IIA).

13. Método de fabricación de un compuesto según la reivindicación 1, que incluye las etapas de: proporcionar un compuesto precursor de aminoalquilamino al compuesto de fórmula (IA) o (IB); y cuaternizar dicho compuesto precursor de aminoalquilamino.

Figura 1

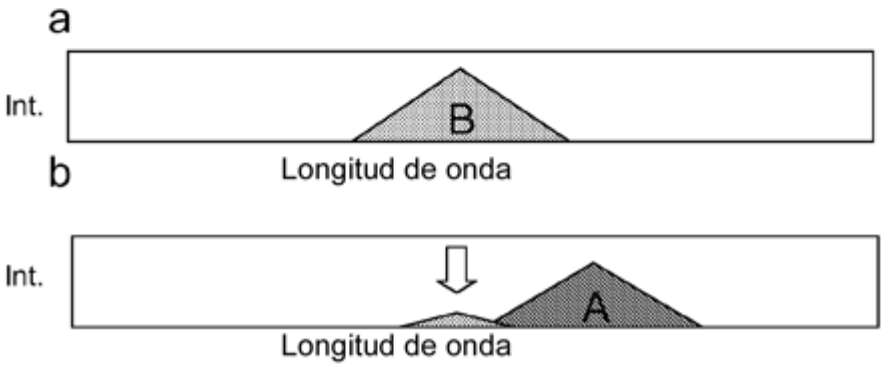


Representación esquemática de ejemplos de espectros de emisión de fluorescencia de 5 fluorocromos diferentes con emisiones solapantes, que identifican colorantes de emisión naranja (B) frente a roja

Colorante $B^{permeante}$ solo (célula viva o muerta) por ejemplo, el compuesto (IIA)

Colorante $A^{no\ permeante}$ solo (únicamente célula muerta) por ejemplo, el compuesto de fórmula (IA)

Figura 2

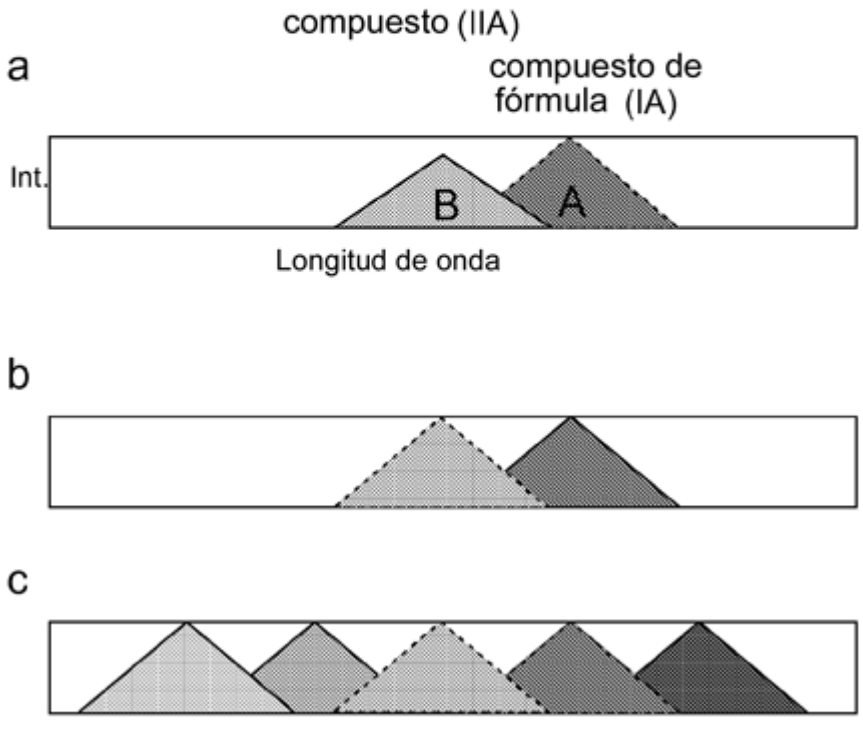


Colorante $B^{permeante}$ + colorante $A^{no\ permeante}$
Células vivas

Colorante $B^{permeante}$ + colorante $A^{no\ permeante}$
Desplazamiento de colorante $B^{permeante}$
en células muertas

Figura 3

Representación esquemática de tinción exclusiva de células vivas o muertas en aplicaciones de múltiples colores



Colorante $B^{permeante}$ + colorante $A^{no\ permeante}$
--- nuevo colorante rojo en células vivas (por ejemplo, Qdot705 en células positivas para el compuesto (IIA) pero negativas para el compuesto de fórmula (IA)

Colorante $B^{permeante}$ + colorante $A^{no\ permeante}$
--- nuevo colorante naranja en células muertas positivas para el colorante $A^{no\ permeante}$

Ejemplo de combinaciones de colorante de múltiples colores basándose en la firma conjunta del compuesto (IIA) y el compuesto de fórmula (IA)

Figura 4

Representación esquemática de una transferencia puntual que indica las características de tinción de grupos de células y sus características definidas usando un análisis dual de tinción del compuesto de fórmula (IA) frente a tinción marcada fluorescentemente con anexina V (por ejemplo, FITC)

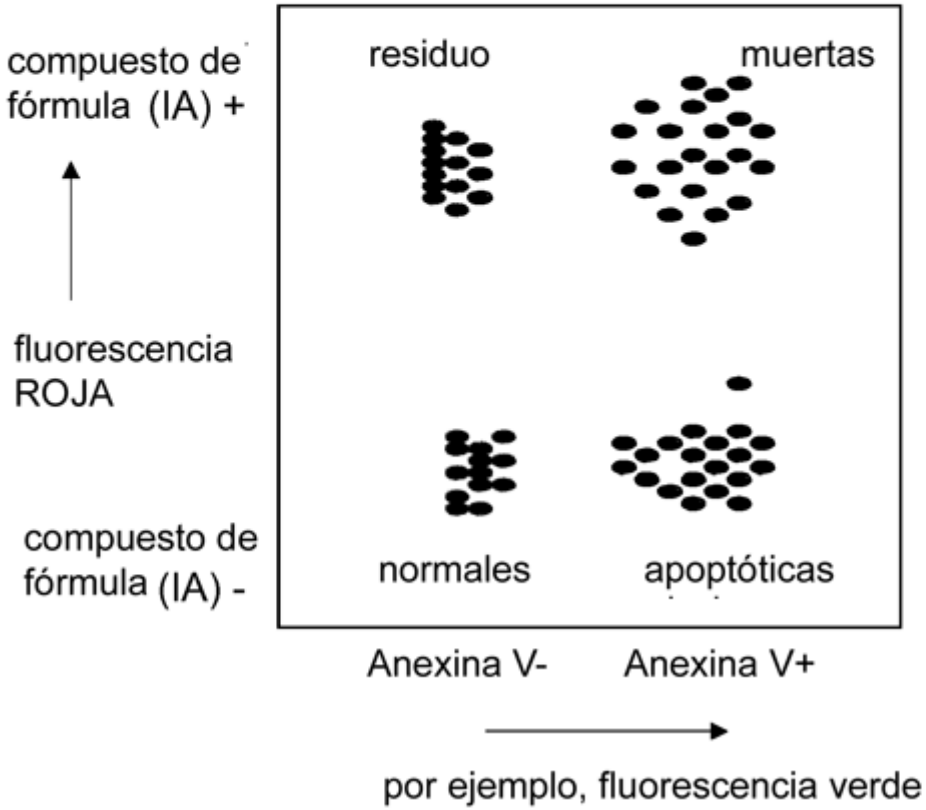


Figura 5

Representación esquemática de una transferencia puntual que indica las características de tinción de grupos de células y sus características definidas usando un análisis dual de tinción con el compuesto (IA) frente al compuesto (IIA)

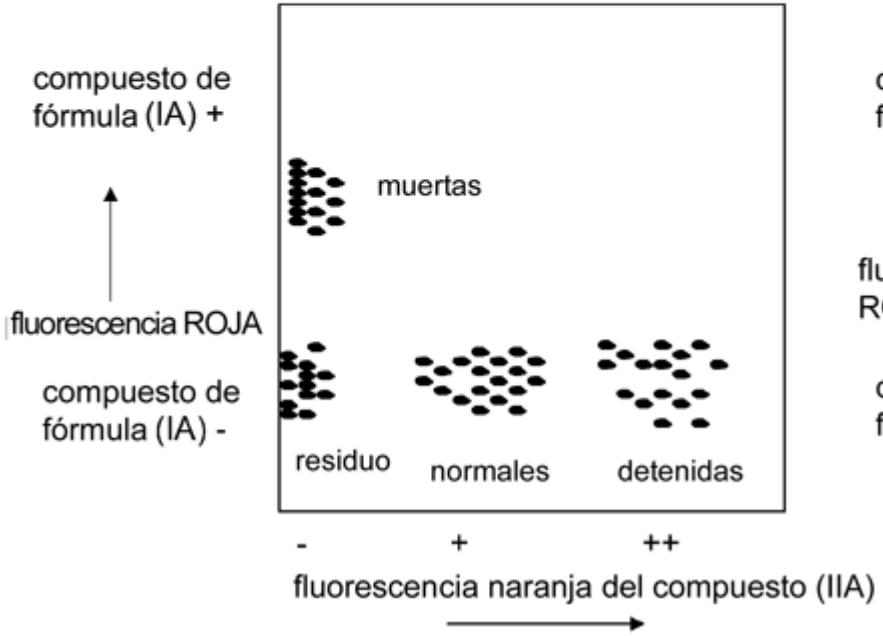


Figura 6

Representación esquemática de una transferencia puntual que indica las características de tinción de grupos de células y sus características definidas usando un análisis dual de tinción con el compuesto (IA) frente al compuesto (IIA)

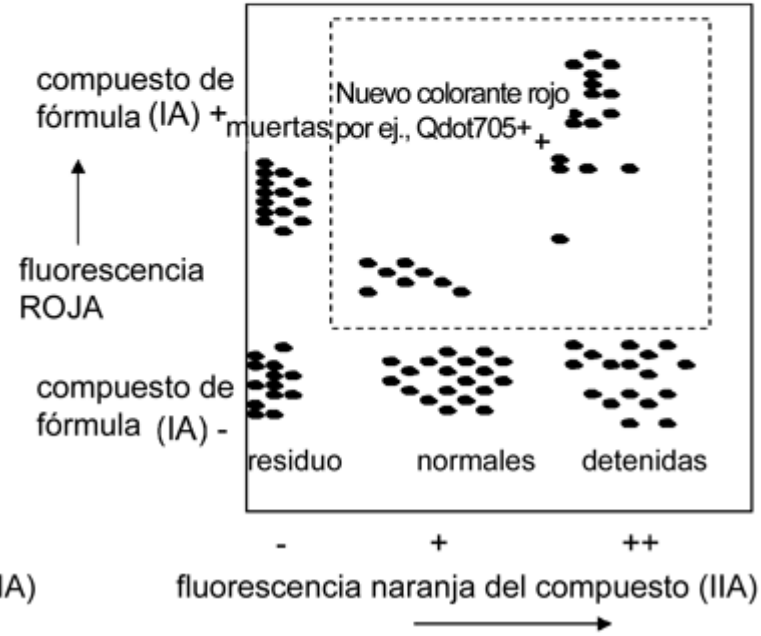
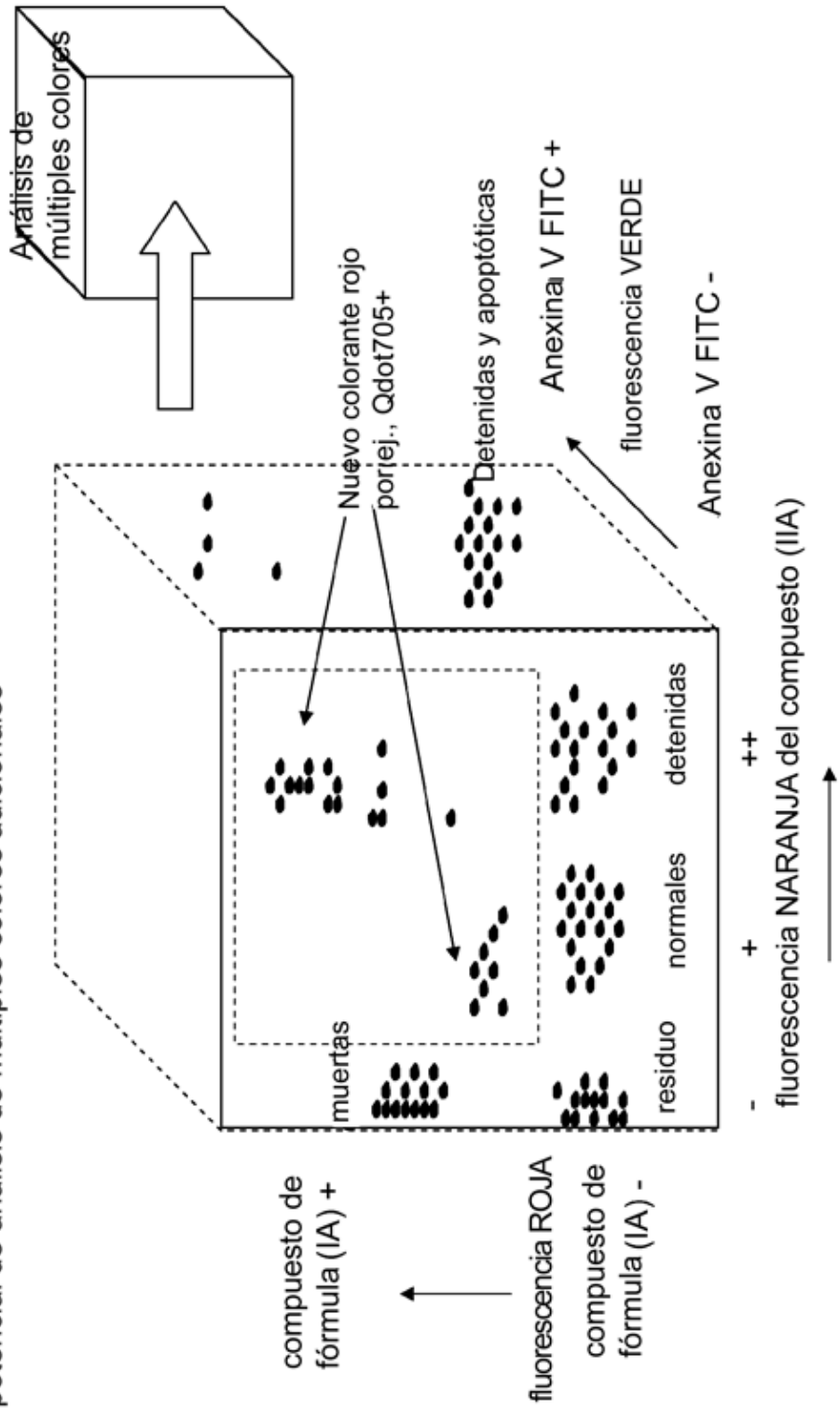


Figura 7

Representación esquemática de una transferencia puntual en 3D que indica las características de tinción de grupos de células y ejemplos de sus características usando un análisis triple de tinción con la unión a anexina V del compuesto de fórmula (IA) frente al compuesto (IIA), y el potencial de análisis de múltiples colores adicionales



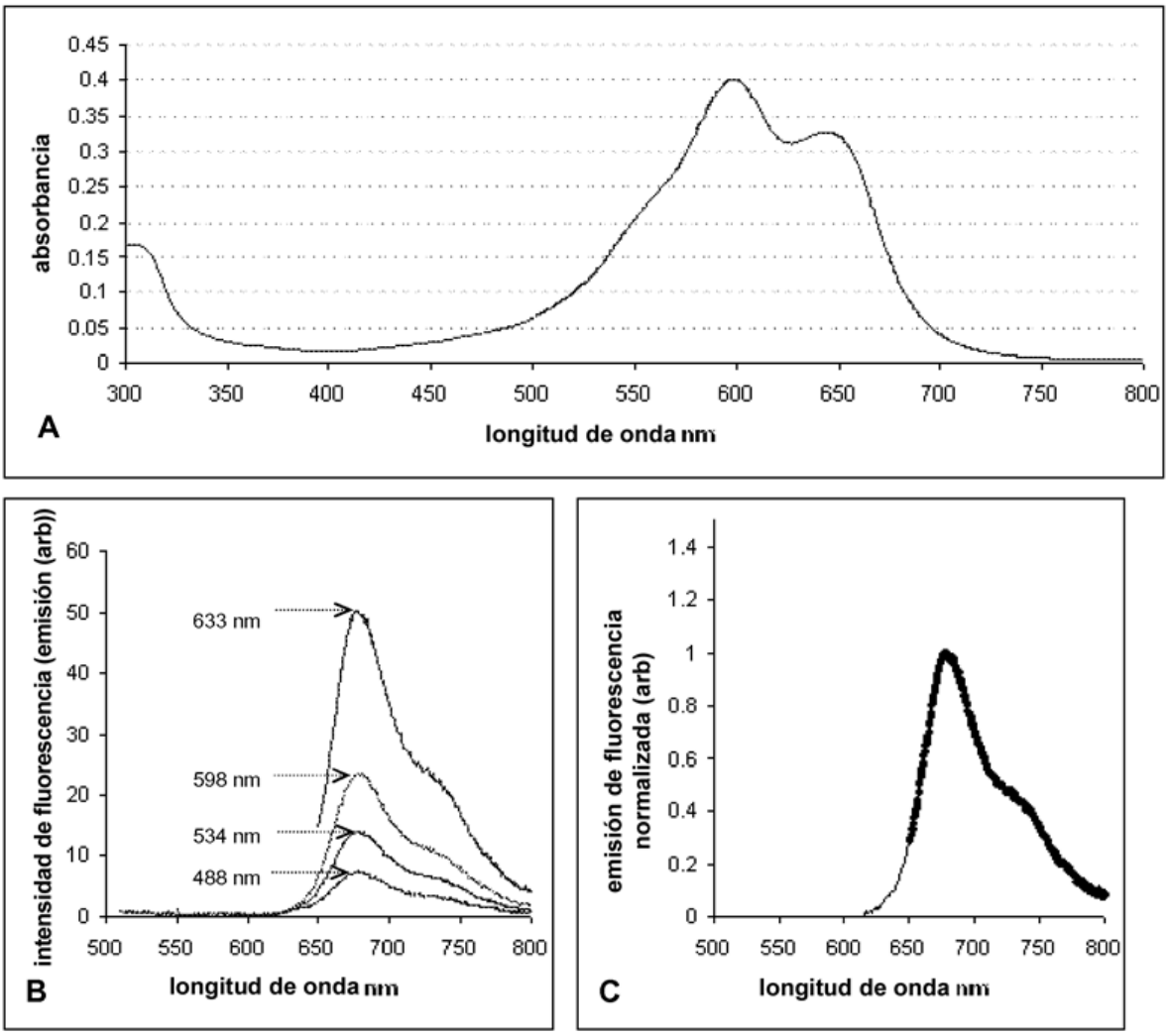


Figura 8: Propiedades espectrales del compuesto de fórmula (IA)

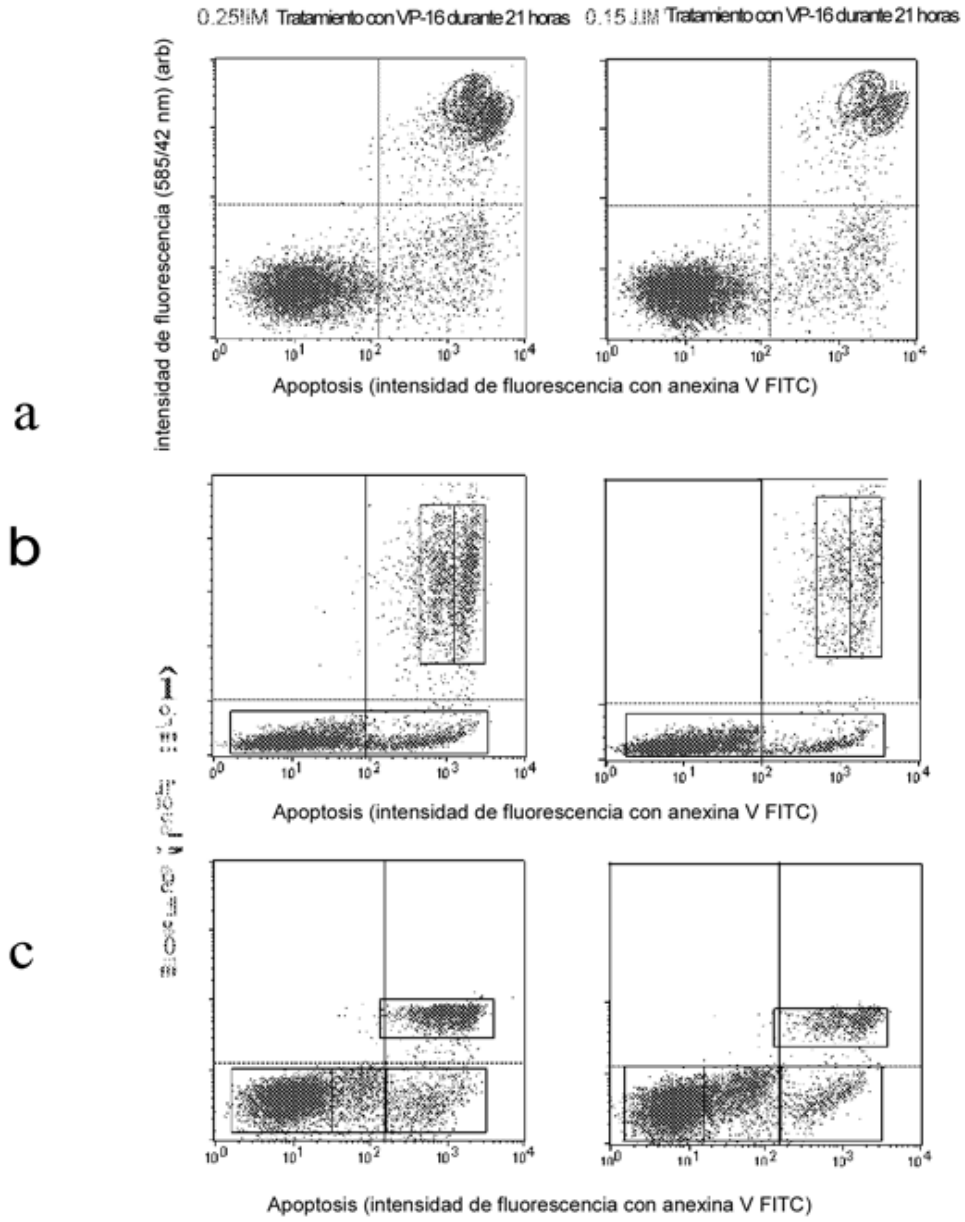


Figura 9: muestra la fluorescencia obtenida a partir de los experimentos usando anexina V-FITC en combinación con (a) yoduro de propidio (PI) con intensidad de fluorescencia de PI en una escala logarítmica, (b) un compuesto de fórmula (IA), con intensidad de fluorescencia del compuesto de fórmula (IA) mostrada en una escala lineal, (c) un compuesto de fórmula (IA), con una intensidad de fluorescencia del compuesto de fórmula (IA) mostrada en una escala logarítmica;

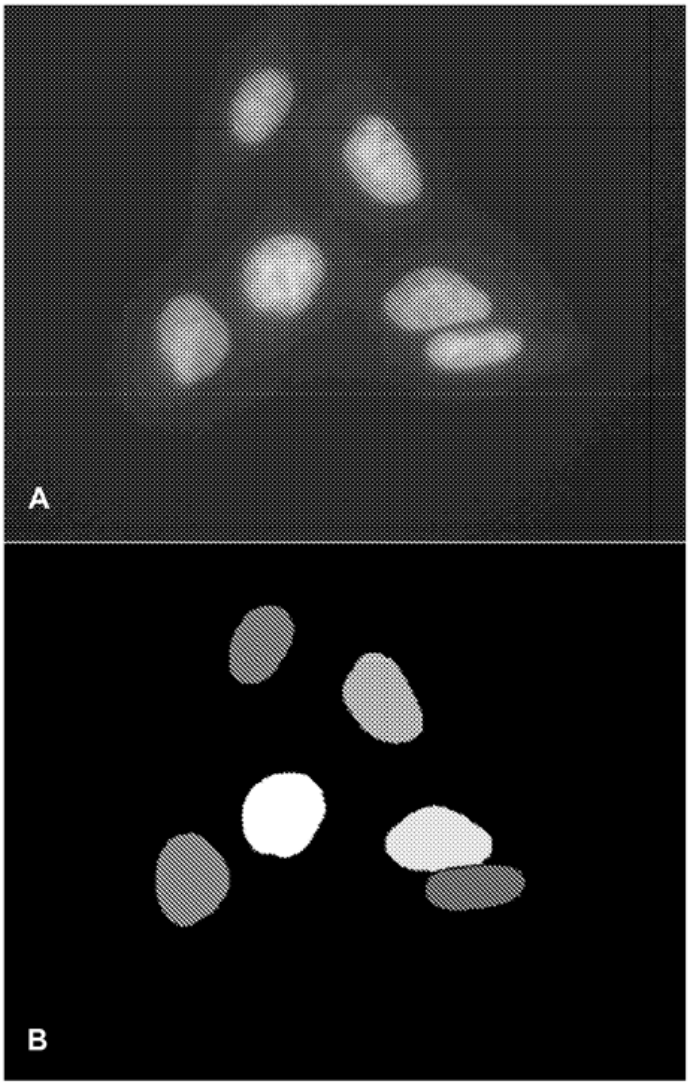


Figura 10: Tinción nuclear prominente de células de osteosarcoma humano U-2 OS usando el compuesto descrito por la fórmula (IA)

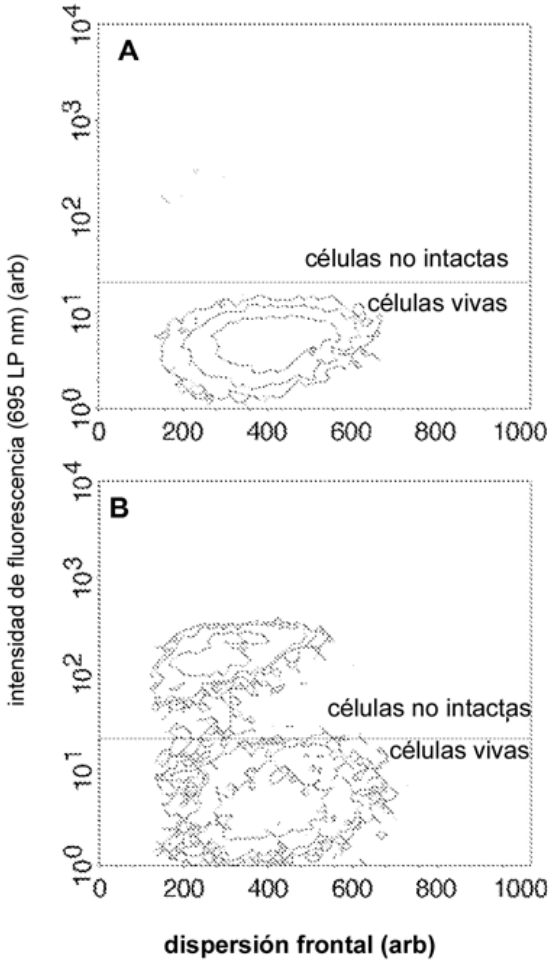


Figura 11: La tinción de células con membranas comprometidas usando el compuesto descrito por la fórmula (IA)

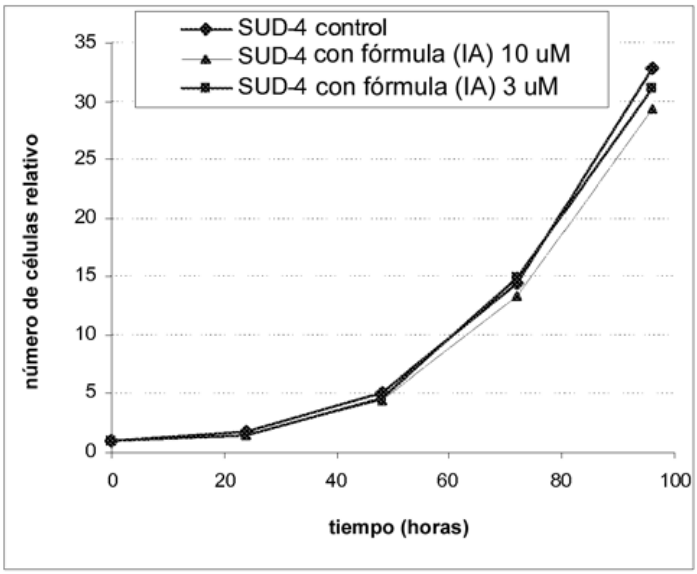


Figura 12: El efecto de la incubación de células de linfoma de células B humanas (SU-DHL-4) con un compuesto de fórmula (IA) que revela la baja toxicidad

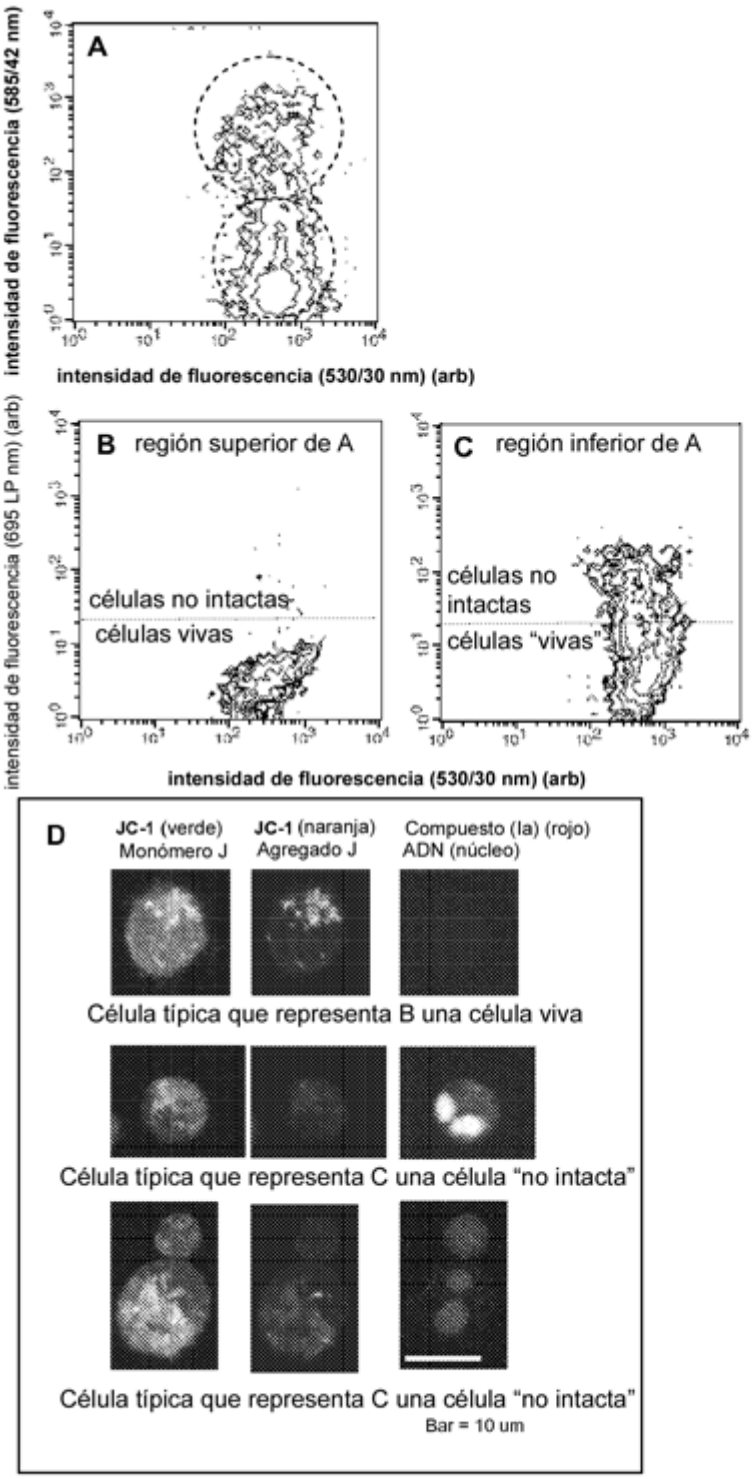


Figura 13: Fase temprana en muerte celular de células Jurkat humanas con la pérdida de potencial de membrana mitocondrial e integridad de la membrana plasmática en respuesta al agente que induce apoptosis, estaurosporina.

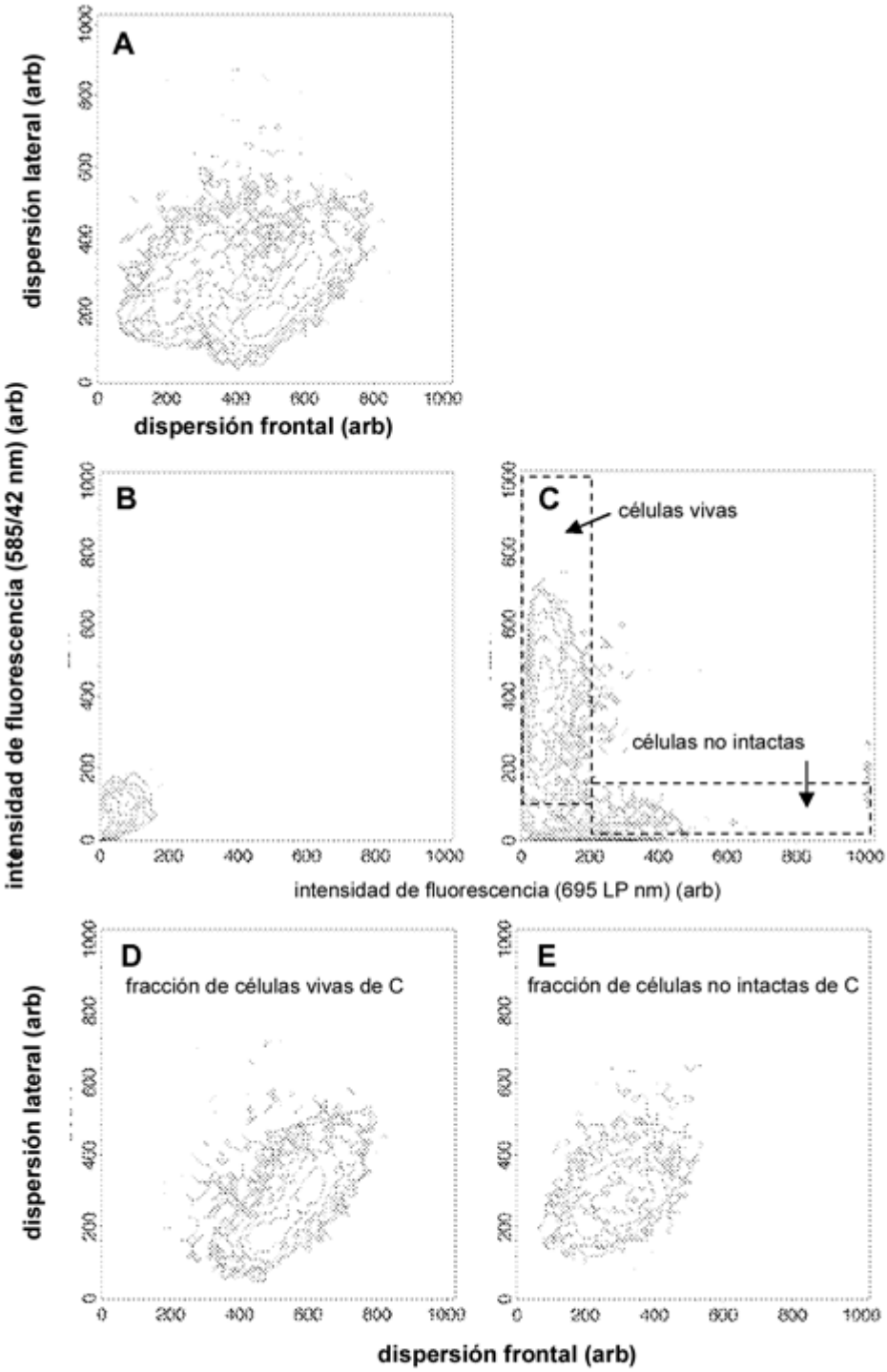


Figura 14: Seguimiento de combinación del estado celular usando sondas fluorescentes codirigidas de compuesto (IA) (células muertas) y compuesto (IIA) (células vivas).