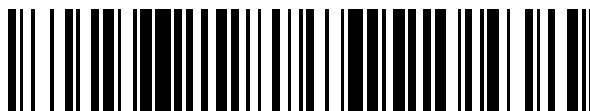


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 360**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
C07J 51/00 (2006.01)
C12N 11/06 (2006.01)
C07D 311/04 (2006.01)
C07D 311/82 (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014** **PCT/EP2014/078758**
87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15091958**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014** **E 14818988 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** **EP 3084431**

54 Título: **Compuestos que comprenden uno o más dominios hidrófobos y un dominio hidrófilo que comprende restos de PEG, útiles para unir células**

30 Prioridad:

20.12.2013 EP 13006038

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstraße 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

JOSEL, HANS-PETER;
HEINDL, DIETER;
FROELICH, THOMAS y
FROEHNER, STEFANIE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 708 360 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

Compuestos que comprenden uno o más dominios hidrófobos y un dominio hidrófilo que comprende restos de PEG, útiles para unir células

5

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que comprenden uno o más dominios hidrófobos y un dominio hidrófilo que comprende restos de PEG, útiles para unir células, así como a usos y composiciones relacionados con los mismos. Los compuestos son útiles para inmovilizar y/o estabilizar células.

10 En el documento US2005/0208644A1, se usa un sistema que emplea dos compuestos para inmovilizar células. En el mismo se desvela un método para inmovilizar una célula en un patrón deseado sobre una superficie en fase sólida mediante el uso de un compuesto químico que tiene una afinidad por la célula. Mediante el uso de otro segundo compuesto químico que se inmoviliza más fácilmente sobre la superficie en fase sólida, el primer compuesto se une al segundo compuesto. El primer compuesto químico se describe como un anclaje biocompatible para membrana
15 (BAM, del inglés *biocompatible anchor for membrane*). Este anclaje tiene un grupo alifático que se une cuando se inserta en la membrana celular y puede inmovilizarse mediante un enlace no covalente sin dañar las células. Kato K. et al., *Biotechnol. Prog.* 2004, 20, 897-904: describe los denominados BAM (BAM90: una cadena de oleílo; DOPE-BAM80: dioleilfosfatidiletanolamina) como útiles como reactivos de anclaje de proteínas en membranas celulares como resultado de la alta solubilidad en agua, la capacidad de anclaje rápido de la proteína en el estrato externo de
20 la membrana celular, la alta retención en la membrana celular y la falta de actividad citolítica, lo que sugiere que esta técnica de anclaje es prometedora para la modificación mediante ingeniería de la superficie celular". Kato K. et al. *BioTechniques* 2003 35: 1014-1021 describen la fijación de células en suspensión mediante moléculas de anclaje biocompatibles, en concreto, oleil-O-oli(etilenglicol)-succinil-N-hidroxi-succinimidil-ésteres sobre superficies.

25 Sin embargo, los compuestos de la técnica anterior tienen varias desventajas. La inmovilización de células usando dichos compuestos no es cuantitativa ni independiente del tipo celular. Además, las mezclas de diferentes tipos celulares, por ejemplo, que se producen de forma natural en una muestra de sangre, no pueden unirse a una superficie cuantitativa e independientemente de los fenotipos celulares. Además, la unión de las células a la superficie no es lo suficientemente fuerte para las etapas de procesamiento posteriores, por ejemplo, la tinción
30 inmunoquímica y el lavado. Otra desventaja de la tecnología del estado de la técnica es que las moléculas enlazadoras descritas pueden ser internalizadas por las células o rechazadas por la célula, dando como resultado finalmente la liberación y/o pérdida de células.

Con respecto a la estabilización de las células, Octavio T. et al. (*Biotechnology and Bioengineering* 1990 36: 911-920) describen la influencia de un agente protector frente a la cizalla, Pluronic F-68 (Poloxámero 188) un tensioactivo no iónico, sobre el hibridoma cultivado con tensión hidrodinámica. En el artículo se desvela que la sensibilidad a la cizalla de las células de mamíferos puede ser un problema que impida el desarrollo del cultivo de células animales a gran escala. Octavio et al. investigaron la relación entre la fluidez de la membrana plasmática, la sensibilidad a la cizalla y la influencia de los reactivos de protección frente a la cizalla añadidos al medio de cultivo.
40 Han demostrado que la fluidez de la membrana plasmática disminuye mediante la adición de colesterol al medio y demostraron que la supervivencia celular de las células sometidas a velocidades de cizalla seleccionadas es mayor cuando se añade colesterol al medio en comparación con el grupo de control. El mismo efecto se ha demostrado para Pluronic F-68.

45 Tomeczkowski J. et al. 1993; *Enzyme and Microbial technology* 15: 849-853 describe el colesterol como un agente fisiológico adecuado para proteger a las células de la tensión por cizalla mediante la disminución de la fluidez de la membrana plasmática. El documento desvela el efecto de la adición de colesterol sobre la cinética de crecimiento y la sensibilidad a la tensión de cizalla de las células de mamíferos adherentes.

50 Laura A. et al. (*Enzyme and Microbial Technology* 2000 26: 324-331) describe el Pluronic F-68 como agente protector frente a la cizalla para las células animales de la tensión hidrodinámica e investigan el mecanismo de acción del Pluronic F-68. Laura et al. revisan otras publicaciones que demuestran que Pluronic F-68 muestra dos mecanismos de protección, un mecanismo físico y uno biológico/celular. Pluronic F-68 reduce el nivel de frecuencia de las fuerzas experimentadas por las células, por ejemplo, estabiliza la capa de espuma y disminuye la velocidad de aumento de las burbujas, reduciendo de este modo las fuerzas de cizalla. A nivel celular, Pluronic F-68 reduce la fluidez de la membrana plasmática.

Se encuentran divulgaciones similares en Thomas C. et al. (*Advances in Bioprocess Engineering* 1998: 137-171); Ramirez O. et al. (*Biotechnological and Bioengineering* 1990; 36: 911-920); Michaels J. et al. (*Biotechnological and Bioengineering* 1991; 38: 169-180) y Sowana D. et al. (*Biochemical Engineering Journal* 2002; 12: 165-173).

60

Miura S et al (*Biomaterials*, 2006, 27 (34): 5828 5835) desvela la encapsulación de islotes con membrana de complejo poliiónico ultrafina a través de poli(etilenglicol)-fosfolípidos anclados a la membrana celular. El documento WO 2013/148579 desvela un péptido C PEGilado.

65

Sin embargo, el colesterol es una molécula hidrófoba y, por tanto, tiene que disolverse en disolventes como DMSO o alcohol, que presentan toxicidad celular a concentraciones superiores al 1 %, dando como resultado una concentración de colesterol limitada que puede usarse para estabilizar las células.

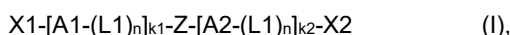
Además, se ha demostrado que las moléculas monovalentes como el colesterol o el Pluronic F-68 tienen propiedades protectoras frente a la cizalla menores en comparación con las moléculas bivalentes. Por tanto, la concentración de los agentes protectores monovalentes, como ya se publicó, tiene que ser mayor en comparación con la de las moléculas bivalentes.

Por último, las moléculas monovalentes pueden internalizarse en el interior de la célula y, por tanto, pueden cambiar la fisiología celular.

Por tanto, existe la necesidad de nuevos compuestos y composiciones que sean capaces de unirse a las células sin afectar a la viabilidad y/o que estabilicen las células. Por ejemplo, dichos compuestos son útiles para estabilizar células, en particular para células expuestas a una tensión tal como la tensión de cizalla, para visualizar células y/o para inmovilizar células.

Los compuestos y composiciones de la invención resuelven este problema y superan las desventajas de la técnica anterior. En particular, los compuestos de la invención son capaces de capturar todos los tipos celulares, abarcando la suspensión y las células adherentes, y estabilizan eficazmente las células.

En una realización, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende, preferentemente que consiste en, uno o más dominios hidrófobos y un dominio hidrófilo, en el que el uno o más dominios hidrófobos están unidos covalentemente a dicho dominio hidrófilo, y en el que el uno o más dominios hidrófobos comprenden cada uno un lípido lineal, que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α -tocoferol, y en el que el dominio hidrófilo comprende un compuesto de Fórmula (I):

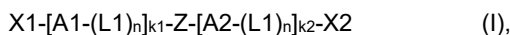


en la que

Z es un resto de polietilenglicol (PEG) lineal que contiene de 1 a 50, preferentemente 4-30 restos $-O-CH_2-CH_2-$, en el que el resto de polietilenglicol comprende opcionalmente 1 o más restos espaciadores SP que conectan dos restos $-O-CH_2-CH_2-$, y en el que el resto de PEG lineal comprende opcionalmente un resto enlazador L3 en uno o ambos extremos, cada L1 es un resto enlazador seleccionado independientemente entre sí, cada n es 0 o 1, seleccionado independientemente entre sí, A1 y A2 son restos bifuncionales o trifuncionales seleccionados independientemente entre sí, a condición de que al menos uno de A1 o A2 sea trifuncional, el resto trifuncional se selecciona entre lisina, serina, serinol, $-O-CH_2-CH((CH_2)_4-NH_2)-CH_2-$, un glicerol y un resto 1,3-diaminoglicerol, en la que el resto bifuncional se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo fosfato, grupo carbamato, grupo amida, un resto que comprende una nucleobase, incluso más preferentemente dT, y un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de C, y cuya cadena de alquilo contiene grupos funcionales en los átomos de C terminales, en particular independientemente seleccionados entre grupos amino, carbonilo, hidroxilo, tiol, ácido carbónico, k1 y k2 se seleccionan independientemente entre sí y k1 es 1, 2, 3, 4 o 5, y k2 es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, X1 y X2 se seleccionan independientemente entre hidrógeno o un grupo protector, L3 se selecciona independientemente entre una cadena lineal de alquilo o alquenoilo con 1 a 10 átomos de C, que está opcionalmente (i) interrumpida por 1 a 3 átomos de N, O o S y/o (ii) sustituida con 1 a 4 grupos hidroxilo, carbonilo, amino o tiol, los 1 o más restos espaciadores SP son independientes entre sí y se seleccionan entre el grupo que consiste en un fosfato y un resto bifuncional, y en la que el uno o más dominios hidrófobos están unidos covalentemente a dicho dominio hidrófilo solo a través de los restos trifuncionales A1,

o una sal del mismo.

Se desvela un compuesto que comprende, preferentemente que consiste en, uno o más dominios hidrófobos y un dominio hidrófilo, en el que el uno o más dominios hidrófobos están unidos covalentemente a dicho dominio hidrófilo, y en el que el uno o más dominios hidrófobos comprenden cada uno un lípido lineal, un esteroide o una vitamina hidrófoba, y en el que el dominio hidrófilo comprende un compuesto de Fórmula (I):



en la que

Z es un resto de polietilenglicol (PEG) lineal que contiene de 1 a 100, preferentemente de 1 a 50, más preferentemente 4-30 restos de -O-CH₂-CH₂-, en el que el resto de polietilenglicol comprende opcionalmente 1 o más restos espaciadores SP que conectan dos restos -O-CH₂-CH₂- y en el que el resto de PEG lineal comprende opcionalmente un resto enlazador L3 en uno o ambos extremos,
 cada L1 es un resto enlazador seleccionado independientemente entre sí,
 cada n es 0 o 1, seleccionado independientemente entre sí,
 A1 y A2 son restos bifuncionales o trifuncionales seleccionados independientemente entre sí, a condición de que al menos uno de A1 o A2 sea trifuncional,
 k1 y k2 son números enteros entre 0 y 10, seleccionados independientemente entre sí, a condición de que al menos uno de k1 y k2 no sea 0,
 X1 y X2 se seleccionan independientemente entre hidrógeno o un grupo protector,
 L3 es una cadena lineal de alquilo o alqueno con 1 a 10 átomos de C, que está opcionalmente (i) interrumpida por 1 a 3 átomos de N, O o S y/o (ii) sustituida con 1 a 4 grupos hidroxilo, carbonilo, amino o tiol,
 y
 en la que el uno o más dominios hidrófobos están unidos covalentemente a dicho dominio hidrófilo a través del dominio o los dominios trifuncionales,

o una sal del mismo.

Un lípido es una pequeña molécula hidrófoba seleccionada entre grasas, ceras, esteroides, vitaminas hidrófobas solubles en grasa, tales como las vitaminas A, D, E y K, ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos.

Una vitamina hidrófoba es una pequeña molécula seleccionada entre el grupo que consiste en vitaminas A, D, E y K. De acuerdo con la invención, la vitamina hidrófoba es α-tocoferol. Un compuesto de ejemplo de la invención que comprende α-tocoferol es 5'-α-TocoferolTEG-PEG2000-Fluos-3'.

Los compuestos de la invención comprenden, preferentemente consisten en, uno o más dominios hidrófobos y un dominio hidrófilo.

Preferentemente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dominios hidrófobos están unidos covalentemente a dicho dominio hidrófilo.

Para los efectos estabilizantes, se encontró que es ventajoso que los compuestos de la invención comprendan preferentemente 2 o 3 o más, más preferentemente 2 o 3 dominios hidrófobos. Como ventaja particular, en una realización específica, al menos un dominio hidrófobo lipídico comprende el esteroide colesterol.

En una realización preferida de la invención, 2 o 3 o más, más preferentemente 2 o 3 dominios hidrófobos de restos hidrófobos se unen covalentemente a dicho dominio hidrófilo.

Para la comprensión general en el presente documento, un "resto hidrófobo" comprende y forma la porción principal de un "dominio hidrófobo", determinando de este modo su carácter hidrófobo.

Los restos hidrófobos para compuestos que comprenden 2 o más restos hidrófobos pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, un compuesto que comprende dos dominios hidrófobos puede comprender 2 restos de ácido mirístico o un resto de ácido mirístico y un resto de colesterol.

Cada uno de los dominios hidrófobos comprende, preferentemente, un lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α-tocoferol.

El lípido lineal, esteroide o vitamina hidrófoba pueden unirse directamente a un resto trifuncional o a través de un enlazador L2. Un ejemplo de compuestos en los que un lípido lineal, esteroide o vitamina hidrófoba se unen directamente a un resto trifuncional es el compuesto ácido mirístico-ácido mirístico(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG. Un ejemplo de compuestos en los que un lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α-tocoferol que se une a través de un enlazador L2 a un resto trifuncional es el compuesto colesterol-TEG-Colesterol-TEG(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG. En este último ejemplo, TEG (tetraetilenglicol) es el enlazador L2.

En una realización preferida, los dominios hidrófobos consisten cada uno en un lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α-tocoferol. En este caso,

es evidente que el dominio hidrófobo es hidrófobo, más preferentemente lipófilo como un lípido lineal, un esteroide o una vitamina hidrófoba es hidrófoba, más preferentemente lipófila.

Un resto hidrófobo se entiende como un resto que se repele de una masa de agua. Preferentemente, el resto es lipófilo; es decir, tiende a disolverse en otras sustancias lipófilas no polares como las grasas o los ácidos grasos.

En otra realización preferida, los dominios hidrófobos comprenden cada uno un lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el colesterol de esteroides o la vitamina hidrófoba α -tocoferol y uno o restos adicionales. En esta realización, el resto hidrófobo en su conjunto es hidrófobo, más preferentemente lipófilo.

En una realización aún más preferida, los dominios hidrófobos de la invención que comprenden un lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α -tocoferol pueden insertarse en una membrana celular. Esto puede determinarse mediante métodos conocidos en la técnica.

En una realización preferida, los 2 o 3 restos hidrófobos de un compuesto de la invención son dominios hidrófobos diferentes o, en el caso de 3 restos hidrófobos, dos son diferentes del tercero o los tres son diferentes uno de otro.

En esta última realización preferida de la invención, un primer dominio hidrófobo comprende, preferentemente consiste en, un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, especialmente ácido mirístico, ácido esteárico o ácido behénico, en particular ácido mirístico y/o un segundo dominio hidrófobo comprende, preferentemente consiste en, colesterol. En el caso de un tercer dominio hidrófobo, este dominio comprende preferentemente, preferentemente consiste en, colesterol o un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, especialmente ácido mirístico, ácido esteárico o ácido behénico, en particular ácido mirístico y/o es el mismo que el primer o segundo dominio hidrófobo.

El principio básico para la unión a células e inmovilizar células de los compuestos de la invención es que una parte hidrófoba terminal del compuesto de la invención se ancla en la bicapa lipídica de una membrana celular de interés. La celda puede, por ejemplo, unirse después a una superficie específicamente modificada y/o puede marcarse para su visualización y/o detección. Además, las mezclas de dichos compuestos pueden usarse para unir todos los tipos celulares. Dependiendo de la parte hidrófoba, también puede conseguirse una unión preferencial o exclusiva a células específicas.

Además, los compuestos de la invención presentan sorprendentemente efectos estabilizantes ventajosos sobre las células y/o efectos de unión o inmovilización sobre las células, como se muestra en detalle en los Ejemplos.

En particular, los compuestos que comprenden un resto de colesterol como un resto hidrófobo se prefieren especialmente.

La estabilización, se ha comprobado en particular el efecto protector frente a la cizalla en particular para el colesterol, el ácido mirístico y el ácido esteárico como restos hidrófobos en los compuestos de la invención (véase el Ejemplo 5).

Se postula que el principio básico es que una parte hidrófoba terminal de la molécula de unión se ancla en la bicapa lipídica de la membrana celular. Esta inmovilización de moléculas hidrófobas disminuye la fluidez de la membrana plasmática y, por tanto, estabiliza la célula.

Para los efectos estabilizantes, los compuestos de la invención comprenden preferentemente 2 o 3 o más, más preferentemente 2 o 3 restos hidrófobos.

Se demostró que esta conformación tiene una mayor afinidad de unión a las células en comparación con las moléculas monovalentes; es decir, moléculas que comprenden un resto hidrófobo de la invención. Por tanto, se necesitan concentraciones más bajas de las moléculas de la invención para alcanzar un efecto protector frente a la cizalla en comparación con las moléculas monovalentes.

La parte hidrófila de la molécula presenta la internalización del compuesto de la invención y el efecto protector frente a la cizalla se induce mediante la incorporación de la parte hidrófoba en la membrana plasmática exterior. Experimentos con compuestos marcados de la invención han confirmado que el compuesto solo se incorpora en la membrana plasmática exterior sin influir en el interior de la célula.

Con respecto a la aplicación del marcado y la inmovilización de células, se descubrió en los Ejemplos que los compuestos con restos hidrófobos muestran un direccionamiento y una retención estricta de todos los tipos celulares (véase en particular el Ejemplo 2). En particular, se encuentra que los restos de colesterol, ácido mirístico, ácido esteárico y ácido behénico son particularmente útiles en los compuestos de la invención para este fin. Con una ventaja de ejemplo y permitiendo alcanzar un direccionamiento celular cuantitativo, el compuesto 5'-ColesterilITEG-

ColesterilTEG-PEG2000-Fluos-3 (Ref interna: BMO 29.891133) representa una realización preferida de la presente invención.

Además, se encontró que se probó en experimentos que compuestos que contienen uno, dos o tres restos hidrófobos son útiles para la inmovilización de células cuantitativa.

De acuerdo con la presente invención, una "molécula enlazadora doble de colesterol" se entiende como un compuesto de la invención que contiene dos restos hidrófobos, que son los dos colesterol. En consecuencia, una "molécula enlazadora triple de ácido mirístico" se entiende como un compuesto de la invención que contiene tres restos hidrófobos, que son todos ácido mirístico.

De acuerdo con la invención, una "molécula enlazadora doble asimétrica" se entiende un compuesto de la invención que contiene dos restos hidrófobos, en el que los dos restos hidrófobos son diferentes uno de otro.

Los compuestos de la invención se describen en los ejemplos principalmente de esta manera modular, esquemática.

De acuerdo con la presente invención, un compuesto "Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG" como se muestra en la Figura 6 A se entiende como un compuesto en el que dos restos de colesterol como restos hidrófobos se unen a un resto trifuncional a través de TEG (tetraetilenglicol).

De acuerdo con la Figura 6, que muestra la descripción modular de los compuestos de la invención en paralelo a la fórmula química, "(EspaciadorC18)" se entiende como un resto de PEG de una longitud de 18 átomos seguido de un resto fosfato como resto espaciador. -(EspaciadorC18)7- se entiende, en consecuencia, como un resto que consiste en 7 restos "(EspaciadorC18)".

De acuerdo con la presente invención, "Fluos" se entiende como un resto de fluoresceína unido directamente a un resto A2 trifuncional.

De acuerdo con la presente invención, "Biotina-TEG" se entiende como un resto de biotina unido a través de un enlazador de TEG a un resto trifuncional A2.

En el caso de los compuestos de la invención que se desvelan de esta manera esquemática, el resto A1 trifuncional es normalmente glicerol para restos hidrófobos unidos a TEG (véase la Figura 6 A). Además, se desvelan igualmente realizaciones con serinol o 6-[(2-hidroxiethyl)amino]-1-Hexanol que reemplaza al glicerol como resto trifuncional. Otras alternativas para dichos restos trifuncionales están disponibles para el experto en la materia.

El resto trifuncional A1 es serinol para el compuesto de la Figura 6A, en el que los restos hidrófobos se unen directamente a un resto trifuncional A1.

De una manera aún más esquemática, "Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG" puede describirse como la estructura "5'-XXYYYYYYYYFF-3'", en la que Y = es un PEG + resto espaciador, X es un resto hidrófobo unido al resto hidrófilo a través de un enlazador trifuncional, F es una fluoresceína de marcador fluorescente y Z es un grupo de unión (biotina). 5' y 3' indican la dirección de la síntesis mediante una síntesis automatizada como se muestra en los Ejemplos en analogía con los nucleótidos.

Análogamente, -PEG2000- se entiende como un resto de PEG2000; es decir, una cadena de polietilenglicol (PEG) que consiste en 45 subunidades C₂H₆O₂.

En los compuestos de la invención que se describen en la parte experimental, L1 está presente (n = 1) y es fosfato si no se indica explícitamente lo contrario.

"Espaciador" en el contexto de compuestos de la invención que se desvelan específicamente en los Ejemplos se entiende como un resto de PEG que incluye un resto fosfato. La longitud del resto de PEG se determina, por ejemplo, mediante C9 o C12, lo que indica que el resto de PEG tiene una longitud de 9 o 12 átomos, respectivamente.

"dT" se entiende como timidina, como se ejemplifica en la Figura 6 B. Este resto dT puede usarse para determinar la concentración de los compuestos por absorción y es un resto bifuncional de acuerdo con la presente invención.

En particular, se encontró que una molécula enlazadora doble de colesterol, una molécula enlazadora doble o triple de ácido mirístico, así como una molécula enlazadora doble de ácido esteárico eran adecuadas para conseguir la inmovilización de células cuantitativa usando leucocitos y diferentes estirpes celulares cultivadas. Además, una combinación de un enlazador doble de colesterol y una molécula enlazadora doble de ácido mirístico muestra un débil aumento de la tasa de inmovilización de algunos tipos celulares en comparación con las moléculas enlazadoras dobles únicas.

También se ha demostrado que un enlazador doble asimétrico que contiene tanto un resto de colesterol como un resto de ácido mirístico también muestra una inmovilización de células cuantitativa.

Además, las moléculas de la invención que contienen 2 o 3 moléculas hidrófobas unidas covalentemente al dominio hidrófilo presentan una unión estrecha de células, utilizando potencialmente un efecto de unión cooperativa. La unión de dichas moléculas a las células es 100-1000 veces más fuerte en comparación con la unión o inmovilización usando un compuesto que contiene solo una molécula hidrófoba.

Además, se prefiere en una realización, que las dos o tres moléculas hidrófobas se separen espacialmente usando restos enlazadores L1. Esto es particularmente útil para una inmovilización cuantitativa de células. Utilizando enlazadores adecuados, se obtienen moléculas de unión adaptadas, que son ideales para, por ejemplo, dirigir e inmovilizar todo tipo de células raras y normales de la sangre.

En dicha realización preferida, $n = 1$ y L1 por tanto está presente.

El dominio hidrófilo de los compuestos de la invención comprende un resto de PEG y, por tanto, es flexible.

La parte o las partes hidrófobas terminales de los compuestos de la invención van seguidas de un largo dominio hidrófilo flexible.

Este dominio hidrófilo permite un plegamiento flexible alrededor de las células de interés requeridas para la inclusión segura de las células, generando de este modo un entorno similar al hidrogel, compatible con las células, que es importante para mantener vivas la morfología y las funciones celulares.

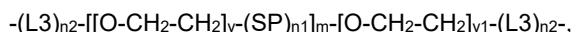
Es posible usar diferentes restos de PEG lineales, que difieren en longitud y/o en que comprenden restos Espaciadores como fosfato entre restos de PEG para conseguir un dominio hidrófilo flexible. Por ejemplo, puede usarse una cadena de polietilenglicol (PEG) que consiste en 45 subunidades de $C_2H_6O_2$ (PEG2000) (véase el Ejemplo 6 B) o restos de PEG con espaciadores de fosfato como $-(\text{EspaciadorC18})_7-$ como se ha descrito anteriormente.

Se conocen en la técnica grupos protectores adecuados. Los grupos protectores adecuados para la química de la fosforamidita son, por ejemplo, (4,4'-dimetoxitritilo (DMT) y fluorenometoxicarbonilo (Fmoc). Un grupo protector particularmente preferido es DMT (4,4'-dimetoxitritilo).

Pueden usarse diversas sales de compuestos de la invención como sales de Na^+ y/o TEA^+ de los compuestos de la invención, como se muestra en la Figura 1.

También son posibles otras sales y son conocidas por los expertos. Preferentemente, se usan sales que no afecten o no afecten sustancialmente la viabilidad o la función celulares.

En una realización preferida de la presente invención, el resto Z tiene la siguiente estructura:



en la que

SP es un resto espaciador,
cada resto espaciador SP se selecciona independientemente entre sí,
cada $n1$ es 0 o 1, seleccionado independientemente para cada uno de los restos m,
cada $n2$ es 0 o 1, seleccionado independientemente entre sí,
m es un número entero de 1 a 50, más preferentemente de 4 a 30,
y es un número entero de 1 a 50, más preferentemente de 4 a 30,
 $y1$ es un número entero de 0 a 30, preferentemente de 0 a 10, más preferentemente de 0 a 4,
a condición de que $y*m + y1 \leq 100$
y en la que L3 es como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida adicional de la presente invención, $n1$ es idéntico para las m restos $-[O-CH_2-CH_2]_y-(SP)_{n1}]_m-$.

Como puede observarse a partir de los ejemplos, $n1$ es normalmente siempre 0 en los compuestos de la invención o siempre 1 en los compuestos de la invención.

Un compuesto de ejemplo en el que $n1 = 1$ es Colesteril-TEG-EspaciadorC12-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)₇-Fluos-Biotina-TEG.

Un compuesto de ejemplo en el que $n1 = 0$ es Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG.

En una realización preferida adicional de la presente invención, y_1 es 0.

Un compuesto de ejemplo en el que $y_1 = 0$ es Colesteril-TEG-EspaciadorC12-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG.

En una realización adicional de la presente invención, y_1 es 1.

Un compuesto de ejemplo en el que $y_1 = 1$ es 5'-ColesterilTEG-ColesterilTEG-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT-BiotinaTEG-3'.

En una realización preferida adicional de la presente invención y es 3, 4, 5 o 6 y n_1 es 1. Incluso más preferentemente m es 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En una realización preferida adicional de la presente invención, los restos espaciadores SP se seleccionan independientemente entre sí entre el grupo que consiste en un fosfato y un resto bifuncional.

Se prefiere que todos los restos espaciadores SP sean iguales. Incluso más preferentemente, todos los restos SP son fosfato.

Un resto bifuncional de acuerdo con la presente invención se entiende como un resto que contiene dos grupos funcionales antes de la síntesis de un compuesto de la invención. Dicho resto bifuncional es, por tanto, adecuado para la síntesis de compuestos lineales. Los grupos bifuncionales se seleccionan entre el grupo que consiste en un grupo fosfato, grupo carbamato, grupo amida, un resto que comprende una nucleobase, incluso más preferentemente dT y un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de C, en particular 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos, y cuya cadena de alquilo contiene grupos funcionales en los átomos de C terminales, en particular independientemente seleccionados entre grupos amino, carbonilo, hidroxilo, tiol, ácido carbónico. Son ejemplos de grupos alquilo lineales adecuados con grupos funcionales terminales son restos de diaminoalquilo tales como $H_2N-(CH_2)_5-NH_2$ o restos de hidroxilo-carbonilo tales como $-C(O)-(CH_2)_4-O-$.

Un resto trifuncional de acuerdo con la presente invención se entiende como un resto que contiene tres grupos funcionales antes de la síntesis de un compuesto de la invención. Dicho resto trifuncional es, por tanto, adecuado para la síntesis de un compuesto ramificado. Se desvela que se seleccionan restos trifuncionales adecuados entre un resto trifuncional que tiene de 1 a 10 átomos de C, en particular 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos de C y que comprenden al menos un grupo -OH, -SH y/o al menos un grupo -NH₂, más preferentemente seleccionado entre un aminoácido. De acuerdo con la invención, el resto trifuncional se selecciona independientemente entre lisina, serina, serinol, $-O-CH_2-CH((CH_2)_4-NH_2)-CH_2-$, glicerol y un resto de 1,3-diaminoglicerol.

En una realización preferida adicional de la presente invención, X_1 y/o X_2 , preferentemente X_1 o X_2 se reemplazan por un dominio hidrófobo. Un compuesto de ejemplo en el que X_1 se reemplaza por un dominio hidrófobo es Biotina-PEG-Lys-(C18)₂ como se muestra en los Ejemplos.

En una realización preferida adicional de la presente invención, los n_2 son ambos 0. En dicha realización, el resto de PEG lineal central se une directamente a los restos $X_1-[A_1-(L_1)n]k_1$ y $[A_2-(L_1)n]k_2-X_2$.

En una realización preferida adicional de la presente invención, uno o ambos $n_2 = 1$ y L_3 es un grupo alquilo con 1 a 10 átomos de C que contiene opcionalmente un grupo amida, grupo carbonilo, carbamato y/o grupo NH. En una realización preferida de la presente invención, L_3 es un grupo alquilo con 1 a 10 átomos de C que opcionalmente contiene un grupo amida, grupo carbonilo, carbamato y/o grupo NH. Por ejemplo, un L_3 puede ser $-NH-CH_2-CH_2-NHCO-CH_2-CH_2-$ como en el compuesto Biotina-PEG2000-Lys-(C18)₂ de la invención.

Se desvela que el lípido lineal es

(a) un ácido graso saturado o insaturado, y/o

(b) un ácido graso que tiene de 8 a 26 átomos de C, preferentemente de 12 a 22 átomos de C, más preferentemente de 14 a 18 átomos de C.

Un ácido graso es un ácido carboxílico con una larga cola (cadena) alifática, que es saturada o insaturada. La mayoría de los ácidos grasos naturales tienen una cadena de un número par de átomos de C, de 4 a 28.

Son ejemplos de ácidos grasos saturados ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico y ácido cerótico.

Son ejemplos de ácidos grasos insaturados adecuados:

Nombre común	Δx	Longitud de la cadena: doble enlace
Ácido miristoleico	cis- $\Delta 9$	14:1
Ácido palmitoleico	cis- $\Delta 9$	16:1
Ácido sapiénico	cis- $\Delta 6$	16:1
Ácido oleico	cis- $\Delta 9$	18:1
Ácido elaídico	trans- $\Delta 9$	18:1
Ácido vaccénico	trans- $\Delta 11$	18:1
Ácido linoleico	cis- $\Delta 9, \Delta 12$	18:2
Ácido linoelaídico	trans,trans- $\Delta 9, \Delta 12$	18:2
Ácido α -linolénico	cis,cis,cis- $\Delta 9, \Delta 12, \Delta 15$	18:3
Ácido araquidónico	cis,cis,cis,cis- $\Delta 5, \Delta 8, \Delta 11, \Delta 14$	20:4
Ácido eicosapentaenoico	cis,cis,cis,cis,cis- $\Delta 5, \Delta 8, \Delta 11, \Delta 14, \Delta 17$	20:5
Ácido erúcico	cis- $\Delta 13$	22:1
Ácido docosahexaenoico	cis,cis,cis,cis,cis,cis- $\Delta 4, \Delta 7, \Delta 10, \Delta 13, \Delta 16, \Delta 19$	

En una realización aún más preferida, el lípido lineal se selecciona entre el grupo que consiste en ácido oleico, ácido mirístico, ácido esteárico y ácido behénico, más preferentemente seleccionado entre el ácido mirístico y el ácido oleico.

En una realización preferida adicional, el esteroide colesterol puede usarse como resto hidrófobo.

Un esteroide es un tipo de compuesto orgánico que contiene una disposición característica de cuatro anillos de cicloalcano que se unen entre sí. El núcleo de los esteroides está compuesto por diecisiete átomos de C unidos entre sí que toman la forma de cuatro anillos condensados: tres anillos de ciclohexano (designados como anillos A, B y C) y un anillo de ciclopentano (el anillo D). Los esteroides varían según los grupos funcionales unidos a este núcleo de cuatro anillos y por el estado de oxidación de los anillos. Los esteroides son formas especiales de esteroides, con un grupo hidroxilo en la posición 3 y una cadena principal derivada de colestano.

En una divulgación adicional,

(a) el esteroide es un esteroide, o

(b) el esteroide se selecciona entre el grupo que consiste en colesterol; una hormona esteroidea, preferentemente un esteroide gonadal, más preferentemente un andrógeno, tal como un esteroide anabólico, androstenediona, dehidroepiandrosterona, dihidrotestosterona o testosterona, un estrógeno, tal como estradiol, estriol o estrona; un progestágeno, tal como progesterona o una progestina, un corticoesteroide, en particular un glucocorticoide o un mineralocorticoide; un ecdiesteroide tal como ecdiesterona; un fitoesteroide; un brasinoesteroide; un hopanoide y un ergosterol.

De acuerdo con la invención, el esteroide es colesterol o la vitamina hidrófoba es α -tocoferol.

En una realización preferida adicional de la presente invención, uno, dos, tres o cuatro, preferentemente uno, dos o tres dominios hidrófobos se unen covalentemente al dominio hidrófilo.

En una realización preferida adicional de la presente invención, los dos o más dominios hidrófobos unidos covalentemente al dominio hidrófilo son diferentes o idénticos.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el dominio o los dominios hidrófobos consisten en un lípido lineal, esteroide o vitamina hidrófoba del compuesto de la invención.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el dominio o los dominios híbridos comprenden, preferentemente, consisten en un lípido lineal, esteroide o vitamina hidrófoba del compuesto de la invención unidos covalentemente a un resto trifuncional A1 a través de un resto enlazador L2.

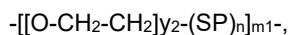
Dichos restos bifuncionales y trifuncionales se emplearon satisfactoriamente en los compuestos de la invención para unir los restos hidrófobos directamente o a través de un enlazador L2.

Se desvela que el enlazador L2 es independientemente cualquier resto enlazador adecuado para unir covalentemente el resto hidrófobo al resto hidrófilo, enlazador que tenga una longitud de 50, 30 o 20 átomos o menos entre el resto hidrófobo y A1 o A2, respectivamente.

En una realización preferida, el enlazador L2 comprende, preferentemente consiste en, un grupo fosfato, un resto $[[O-CH_2-CH_2]_{y2}-(SP)_n]_{m1-}$, en el que SP y n son como se han definido anteriormente, preferentemente n = 0, y2 es un

número entero de 1 a 30, preferentemente de 3 a 10 y m1 es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 3, un resto de glicerol, un grupo carbamato, un grupo amida, un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de C, en particular 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos, y cuya cadena de alquilo contiene grupos funcionales en los átomos de C terminales, en particular seleccionados independientemente entre grupos amina, carbonilo, hidroxilo, tiol, ácido carbónico que están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, 4 o 5 restos R1, en los que R1 es independientemente un alquilo C1-C4, un hidroxialquilo C1-C4, aminoalquilo C1-C4, un cianoalquilo C1-C4, un hidroxilo, un tiol, un amino o un resto carbonilo. Son ejemplos de grupos alquilo lineal adecuados con grupos funcionales terminales los restos diaminoalquilo tales como restos $H_2N-(CH_2)_5-NH_2$ o hidroxilo-carbonilo tales como $-C(O)-(CH_2)_4-O-$. Preferentemente, el grupo alquilo lineal no está sustituido. Incluso más preferentemente, el lípido lineal, esteroide o vitamina hidrófoba están unidos a un resto trifuncional A1 a través de un resto enlazador $-(O-CH_2-CH_2)_j-$, en el que j se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, preferentemente j es 3, en particular tetraetilenglicol (TEG), un resto fosfato o un resto que comprende un TEG, glicerol y un resto de fosfato o un resto que comprende o consiste en -TEG-gliceril-fosfato- $O-(CH_2)_4-C(O)-$.

En una realización más preferida, los compuestos de la invención comprenden un lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α -tocoferol unidos covalentemente a un resto trifuncional A1 a través de un resto enlazador L2, preferentemente en el que L2 se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo fosfato, amida, carbamato, éster y un resto



en el que

SP y n son como se han definido anteriormente, preferentemente $n = 0$, $y2$ es un número entero de 1 a 30, preferentemente de 3 a 10, y $m1$ es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 3, más preferentemente en el que la vitamina el lípido lineal, esteroide o vitamina hidrófoba están unidos a un resto trifuncional A1 a través del resto enlazador tetraetilenglicol (TEG) o fosfato.

En una realización preferida adicional de la presente invención, k1 es 1, 2, 3, 4 o 5, preferentemente 1, 2 o 3.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el dominio o dominios hidrófobos se unen covalentemente a dicho dominio hidrófilo solo a través del resto o los restos trifuncionales o a través del dominio $X1-[A1-(L1)_n]_{k1}$ descrito anteriormente. Para dichas realizaciones, también se aplican las realizaciones preferidas adicionales de los compuestos de la invención. En dichos compuestos, los dominios hidrófobos se localizan exclusivamente en una parte terminal de la molécula, mientras que grupos adicionales como grupos de unión o restos marcados, si están presentes, se localizan en la otra parte terminal, separados espacialmente de los mismos.

En una realización preferida adicional de la presente invención, k2 es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente 1, 2 o 3.

En el caso de que el compuesto de la invención comprenda un resto dT como resto bifuncional A2, k2 es preferentemente 3, 4, 5 o 6.

En otra realización preferida de la invención, k1 es 0 y X1 se reemplaza por un dominio hidrófobo, que preferentemente comprende el esteroide colesterol. En una realización particularmente preferida, Z es un resto $-(L3)_{n2}-TEG(L3)_{n2}-$, en el que $n2$ es independientemente 0 o 1. En una realización aún más preferida de la presente invención, k2 es 1, 2, 3, 4, 5 o 6 preferentemente 3, 4, 5 o 6. Incluso más preferentemente uno o más, en particular uno, resto o restos hidrófobos adicionales se unen al resto $[A2-(L1)_n]_{k2}X2$, en el que el resto o los restos hidrófobos adicionales comprenden el esteroide colesterol. Aún más preferentemente, L2 es un resto enlazador de tetraetilenglicol (TEG), fosfato o un resto que comprende un TEG, glicerol y un resto fosfato o un resto que comprende o que consiste en -TEG-gliceril-fosfato- $O-(CH_2)_4-C(O)-$. Un ejemplo de compuesto de la invención es Col-TEG-Col-TEG-Doblador-Biotina-dT mostrado en la Figura 12.

En el caso de que un compuesto de la invención comprenda un resto dT como el resto bifuncional A2, k2 es preferentemente 3, 4, 5 o 6.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el compuesto comprende adicionalmente un resto marcador y/o un grupo de unión.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el compuesto comprende adicionalmente un resto marcador y/o un grupo de unión.

En una realización aún más preferida de la presente invención, el compuesto comprende adicionalmente un resto marcador.

Dichos compuestos son particularmente útiles para fines de marcado celular. Un compuesto de ejemplo de la invención es 5'-ColesterilTEG-ColesterilTEG-PEG2000-Fluos-3'.

En una de dichas realizaciones preferidas, el compuesto no contiene adicionalmente un grupo de unión.

En otra realización aún más preferida de la presente invención, el compuesto comprende adicionalmente un grupo de unión. Un compuesto de ejemplo es 5'-ColesterilTEG-ColesterilTEG-PEG2000-BiotinTEG-3.

En una de dichas realizaciones preferidas, el compuesto no contiene adicionalmente un resto de marcador.

En una realización aún más preferida de la presente invención, el compuesto comprende adicionalmente un resto marcador y un grupo de unión.

Dichos compuestos son adecuados en particular para aplicaciones en las que debe conseguirse tanto la inmovilización como la detección de células, por ejemplo, para la localización de células inmovilizadas o para la cuantificación de células. Un ejemplo de dicho compuesto es 5'-(Colesteril-TEG)₂-PEG2000-Fluos-Biotina_TEG-3', que se usó satisfactoriamente para inmovilizar células en una placa recubierta de estreptavidina y detectar estas células.

Los restos marcadores adecuados son restos adecuados para la detección in vitro y son conocidos por un experto. La detección puede ser directa, como en el caso de la luminiscencia, en particular la fluorescencia, o indirecta en el caso de una enzima o sustrato de la misma. Por tanto, pueden emplearse ambos restos marcadores adecuados para la detección indirecta o indirecta.

"Marcador" o "resto marcador", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que sea capaz de producir una señal para la detección directa o indirecta. Por tanto, el resto marcador puede detectarse directa o indirectamente. Para la detección directa, puede seleccionarse un resto marcador adecuado para su uso en la presente invención de cualquier grupo marcador detectable conocido, como cromógenos, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, ésteres de acridinio o dioxetanos), compuestos electroquimioluminiscentes, colorantes o colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de las mismas), complejos metálicos luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio y radioisótopos.

En sistemas de detección indirecta, un primer compañero de un par de unión de bioafina es un resto marcador de los compuestos de la invención; es decir, un primer compañero se une covalentemente y es parte del compuesto de la invención. Son ejemplos de pares de unión adecuados hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario y receptor/ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Los miembros del primer par de unión preferidos comprenden hapteno, antígeno y hormona. También se prefieren haptenos como un marcador, digoxina y biotina y análogos de los mismos. El segundo compañero de dicho par de unión, por ejemplo, un anticuerpo, estreptavidina, etc., por lo general se marca para permitir la detección directa, por ejemplo, mediante los restos marcadores como se han mencionado anteriormente.

Por tanto, en una realización preferida, el resto marcador es un resto marcador para el marcador directo o para el marcador indirecto.

En una realización preferida, el resto marcador se selecciona entre (a) un resto marcador directo seleccionado entre el grupo que consiste en un cromógeno, un grupo quimioluminiscente (por ejemplo, éster de acridinio o dioxetano), un compuesto electroquimioluminiscente, un colorante, un colorante fluorescente (por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), un complejo metálico luminiscente, tal como un complejo de rutenio o europio y un radioisótopo; (b) o uno de los compañeros de un sistema de detección indirecto, preferentemente en el que el resto marcado es uno de los miembros de los pares de unión seleccionados entre el grupo que consiste en (i) hapteno o antígeno/anticuerpo, (ii) biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, (iii) azúcar/lectina, (iv) ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario y (v) receptor o fragmento de receptor/ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea.

Los miembros del primer par de unión preferidos como restos marcadores adecuados para la detección indirecta comprenden hapteno, antígeno y hormona. También se prefieren haptenos como digoxina y biotina y análogos de los mismos. El segundo compañero de dicho par de unión, por ejemplo, un anticuerpo, estreptavidina, etc., se marca normalmente para permitir la detección directa, por ejemplo, por los restos marcadores directos como se ha mencionado anteriormente; sin embargo, también es posible emplear un anticuerpo en un compuesto de la invención y usar un antígeno marcado o hapteno para la detección.

En la descripción anterior de miembros de pares de unión, se entiende que el término anticuerpo abarca tanto anticuerpo como fragmentos de unión a antígeno del mismo.

5 En una realización preferida, el resto marcador es un resto marcador para marcado directo, incluso más preferentemente el resto marcador es un resto o colorante fluorescente.

10 Se conocen en la técnica restos (o colorantes) fluorescentes adecuados y abarcan fluoresceína, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy2, Cy3.5, Cy3b, Cy7, un colorante Alexa Fluor, un derivado de xanteno tal como rodamina, verde Oregón, eosina o rojo de Texas, un derivado de cianina tal como cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina y merocianina, un derivado de naftaleno tal como derivados de dansilo y prodano, un derivado de cumarina, un derivado de oxadiazol, tal como piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol y benzoxadiazol, un derivado de pireno tal como azul cascada, un derivado de oxazina, tal como rojo Nilo, azul Nilo, violeta de cresilo, oxazina 170, un derivado de acridina, tal como proflavina, naranja de acridina, amarillo de acridina, un derivado de arilmetina, tal como auramina, cristal violeta, malaquita verde, un derivado de tetrapirrol tal como porfina, ftalocianina y bilirrubina.

15 En los ejemplos, se usó fluoresceína como marcador representativo. Esto permite la detección sensible de un marcador, permitiendo la localización y/o la cuantificación de un marcador. Un marcador fluorescente es un resto marcador particularmente preferido de la invención.

20 Son conocidos por los expertos isótopos o radioisótopos radiactivos adecuados para marcar y métodos para marcar un compuesto de la invención con dicho radiomarcador. Por ejemplo, puede usarse uno de los siguientes isótopos: ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{123}I , ^{125}I y ^{131}I .

25 En caso de que un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno se usen como miembros del sistema indirecto anticuerpo/antígeno o hapteno, ya sea un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno específico para el epítipo o hapteno puede ser parte del compuesto de la invención, o el epítipo o hapteno puede ser parte del compuesto de la invención. En consecuencia, el otro miembro respectivo puede marcarse directamente, por ejemplo, con un marcador fluorescente para la detección posterior. Se describen anticuerpos adecuados o fragmentos de unión a antígeno a continuación con más detalle.

30 En una realización preferida de la invención, un grupo de unión y/o marcador está unido al resto $[\text{A2}-(\text{L1})_n]_{\text{k2}}-\text{X2}$.

35 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el dominio o los dominios hidrófobos se unen covalentemente a dicho dominio hidrófilo solo a través del resto o los restos trifuncionales A1 (o a través del dominio $\text{X1}-[\text{A1}-(\text{L1})_n]_{\text{k1}}$ descrito anteriormente) y un grupo de unión y/o resto marcador está unido al resto $[\text{A2}-(\text{L1})_n]_{\text{k2}}-\text{X2}$. Esto garantiza la separación espacial de los dominios hidrófobos para la inserción en una membrana celular y los restos para la inmovilización y/o el marcado.

40 Dichos compuestos son particularmente adecuados para la inmovilización en caso de que esté presente un grupo de unión.

Dichos compuestos son particularmente adecuados para el marcado y la detección en caso de que esté presente un resto marcador.

45 En otra realización particularmente preferida de la presente invención, el dominio o los dominios hidrófobos se unen covalentemente a dicho dominio hidrófilo solo a través del resto o los restos trifuncionales A1 (o a través del dominio $\text{X1}-[\text{A1}-(\text{L1})_n]_{\text{k1}}$ descrito anteriormente) y un grupo de unión y un resto marcador se unen al resto $[\text{A2}-(\text{L1})_n]_{\text{k2}}-\text{X2}$.

50 Dichos compuestos permiten adicionalmente la inmovilización y el marcado, la detección y la cuantificación.

55 En una realización aún más particularmente preferida de la presente invención, el dominio o los dominios hidrófobos se unen covalentemente a dicho dominio hidrófilo solo a través del resto o los restos trifuncionales (o a través del dominio $\text{X1}-[\text{A1}-(\text{L1})_n]_{\text{k1}}$ descrito anteriormente) y un grupo de unión, pero un resto marcador no se une al resto $[\text{A2}-(\text{L1})_n]_{\text{k2}}-\text{X2}$.

Dichos compuestos pueden usarse si solo se pretende la inmovilización de células unidas.

60 Un grupo de unión es un resto que es adecuado para inmovilizar un compuesto de forma reversible o irreversible, y/o de forma covalente o no covalente a un soporte, en particular un soporte sólido. En una realización preferida, el grupo de unión es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un receptor o un sitio de unión del mismo, un ligando de un receptor, una enzima o un sitio de unión de la misma, un sustrato de una enzima, un sitio de unión al marcador, un marcador o un grupo químico funcional.

65 Un grupo químico funcional puede ser, por ejemplo, un grupo tiol que puede unirse a una superficie de sustrato recubierta de oro mediante la formación de un enlace -S-S- covalente e irreversible.

La unión de biotina a estreptavidina o anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es no covalente y reversible. Dichos grupos de unión que emplean unión no covalente a un soporte sólido se prefieren en caso de que se pretenda separar nuevamente las células para un uso adicional, por ejemplo, para la administración en un modelo animal.

5 En una realización preferida, el grupo de unión puede ser, por ejemplo, un resto de biotina que permita la unión no covalente a una superficie recubierta con estreptavidina o un grupo tiol que pueda unirse a una superficie de sustrato recubierta de oro como soporte sólido.

10 En una realización aún más preferida de la presente invención, un compuesto de la invención comprende un resto marcador y/o un grupo de unión, en el que el resto marcador es un marcador fluorescente y/o el grupo de unión es biotina.

15 En una realización aún más preferida, un compuesto de la invención comprende un resto marcador y un grupo de unión, en el que el resto marcador es un marcador fluorescente y el grupo de unión es biotina.

20 La expresión "soporte sólido" se refiere a un material en fase sólida que interactúa con reactivos en la fase líquida por reacciones heterogéneas. El uso de soportes sólidos es bien conocido en los campos de la química, la bioquímica, la farmacia y la biología molecular. Se han desarrollado muchos tipos de soportes sólidos dependiendo del problema técnico que se va a resolver. Cualquiera de estos puede usarse en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, el soporte sólido utilizado en los métodos de la presente invención puede incluir componentes de sílice, acetato de celulosa, nitrocelulosa, nylon, poliéster, polietersulfona, poliolefina o fluoruro de polivinilideno o combinaciones de los mismos. Otros soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, vidrio de poro controlado, una placa o portaobjetos de vidrio, poliestireno y dextrano activado. En otros aspectos, los polímeros orgánicos sintéticos tales como poli(acrilamida), polimetacrilato y poliestireno también son superficies de soporte ilustrativas. Además, polisacáridos tales como la celulosa y el dextrano son otros ejemplos ilustrativos de superficies de soporte. También son operables otras superficies de soporte tales como fibras.

30 El soporte sólido puede estar contenido en un recipiente, en el que el recipiente es un tubo, tal como un tubo de centrífuga o tubo de centrifugación, jeringas, cartuchos, cámara, placa de pocillos múltiples o tubo de ensayo, o combinaciones de los mismos. El soporte sólido puede tratarse previamente o funcionalizarse para permitir la inmovilización de las células. Por ejemplo, una placa de pocillos puede tratarse previamente con estreptavidina como se muestra en los ejemplos. En una realización, el soporte sólido puede ser fibroso o estar en forma de partículas, permitiendo por lo general un contacto apropiado. El tamaño del soporte sólido adecuado para su uso puede variar. Las células pueden estar unidas a un solo soporte sólido (por ejemplo, un recipiente o placa de múltiples pocillos) o pueden estar unidas a una multitud de soportes sólidos (por ejemplo, perlas). La forma del soporte sólido adecuado para su uso puede ser, por ejemplo, una lámina, un disco precortado, un cilindro, una fibra única o un soporte sólido compuesto de partículas. En una realización preferida, el soporte sólido es plano o sustancialmente plano con cavidades. En una realización, el soporte sólido puede ser fibroso o particulado. El tamaño del soporte sólido puede variar y puede elegirse dependiendo del método o la aplicación que se ha de realizar.

45 En algunas realizaciones, la fase sólida es una tira reactiva, un chip, en particular un chip de micromatriz o de nanomatriz, una placa de microtitulación o una micropartícula.

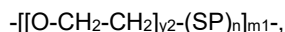
En una realización más preferida, un resto marcador y/o un grupo de unión, cuando está presente, está o están unidos covalentemente a través del resto A2 trifuncional, como se ha descrito anteriormente.

50 En otra realización, uno o más restos A2 son un resto marcador bifuncional o trifuncional o un grupo de unión, más preferentemente un resto A2 es un resto que comprende una nucleobase, incluso más preferentemente un resto A2 es dT (timidina). Dichos compuestos que comprenden dT se usaron para determinar la concentración del compuesto.

55 En una realización preferida adicional de la presente invención, los enlazadores L1 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un grupo fosfato, amida, carbamato y éster.

60 De acuerdo con la presente invención, los restos A1 y A2 se seleccionan independientemente entre un grupo bifuncional seleccionado entre el grupo que consiste en un grupo fosfato, grupo carbamato, grupo amida, un resto que comprende una nucleobase, incluso más preferentemente dT y un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de C, y cuya cadena de alquilo contiene grupos funcionales en los átomos de C terminales, en particular, seleccionados independientemente entre amina, carbonilo, hidroxilo, tiol, grupos de ácido carbónico y un resto trifuncional seleccionado entre lisina, serina, serinol, $O-CH_2-CH((CH_2)_4-NH_2)-CH_2-$, un glicerol y un resto de 1,3-diaminoglicerol.

65 En otra realización más preferida de la presente invención, los enlazadores L2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un fosfato, amida, carbamato, un grupo éster y un resto



en el que

- 5 SP y n son como se han definido anteriormente, preferentemente $n = 0$,
 y_2 es un número entero de 1 a 30, preferentemente de 3 a 10, y
 m_1 es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 3.

10 Se demostró que los enlazadores a base de PEG, en concreto los enlazadores de TEG son útiles en los compuestos de ejemplos de la invención. Un compuesto de ejemplo es 5'-ColesterilTEG-ColesterilTEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinaTEG-3'.

15 Los compuestos de la invención, así como los compuestos intermedios de los mismos, pueden prepararse mediante métodos conocidos por un experto. Una síntesis de ejemplo de un compuesto de la invención se muestra en la Figura 6C. Además, se muestran compuestos intermedios utilizados en la síntesis de los compuestos de la invención en la Figura 12. Adicionalmente, el concepto general de las síntesis se describe brevemente en el Ejemplo 1 para los compuestos. Los compuestos pueden prepararse en fase sólida de forma análoga a la síntesis de nucleótidos a base de fosforamidita. Los compuestos pueden sintetizarse por síntesis sobre un soporte sólido como CPG, como se describe en los Ejemplos. En particular, los compuestos pueden sintetizarse mediante etapas de acoplamiento
 20 posteriores en condiciones conocidas por un experto y escisión del soporte sólido (en los ejemplos: CPG (vidrio de poro controlado)). También pueden usarse otros soportes sólidos tales como poliestireno macroporoso para la síntesis. La síntesis puede realizarse reteniendo un grupo protector o escindiendo el grupo protector. En particular, los compuestos pueden sintetizarse en modo DMT activado o modo DMT desactivado, dejando la molécula de DMT en el extremo de la molécula designado como extremo 3' o separando el grupo de DMT. Los compuestos se
 25 purifican opcionalmente adicionalmente, por ejemplo, mediante diálisis.

La síntesis de Biotina-PEG-Lys-(C18) 2 se describe en detalle en la Figura 6 C).

30 Los otros compuestos de la invención pueden prepararse de una manera análoga de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

En una realización adicional más, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto de la invención unido a al menos una célula, preferentemente una célula viable. Dicha composición proporciona una célula estabilizada. Dependiendo de la presencia adicional de un resto marcador y/o grupo de
 35 unión, la composición es útil para la detección y/o inmovilización de la célula, respectivamente.

En una realización preferida de la divulgación, dicha composición comprende adicionalmente un soporte sólido, al que al menos un compuesto de la invención se une a través de un grupo de unión. En dicha realización, al menos una célula se inmoviliza en un soporte sólido a través de un compuesto de la invención. En caso de que el
 40 compuesto contenga adicionalmente un resto marcador, es posible la localización, detección y cuantificación de la célula o células.

En otra realización preferida de la divulgación, se suspende una composición que comprende al menos un compuesto de la invención unido a al menos una célula comprende una solución acuosa tamponada, en la que al
 45 menos una célula a la que se une al menos un compuesto de la invención. Dicha composición es adecuada para estabilizar adecuadamente las células de la misma, por ejemplo, durante FACS o centrifugación.

Los compuestos son adecuados para unirse a cualquier célula que contenga una bicapa lipídica. Preferentemente, las células son células eucariotas, más preferentemente animales, incluso más preferentemente células de
 50 vertebrados, más preferentemente células humanas.

En una realización preferida adicional, la célula es un leucocito, una célula rara, una célula tumoral o una célula mutada, más preferentemente un vertebrado o un leucocito humano, una célula rara, una célula tumoral o una célula mutada.
 55

En una realización adicional, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende uno o más compuestos de la invención.

Podría demostrarse que algunas composiciones que comprenden dos o más compuestos diferentes de la invención son en particular útiles para el marcado independiente del tipo de célula, como se muestra en los ejemplos.
 60

Por tanto, en otra realización, la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos tres compuestos diferentes de la invención, en la que los diferentes compuestos difieren al menos en sus dominios hidrófobos y en la que los diferentes compuestos comprenden un resto marcador.
 65

Mediante el uso de una diversidad de compuestos de la invención de los cuales al menos dos difieren al menos en su dominio o dominios hidrófobos, puede obtenerse una composición que marque todos los tipos celulares, proporcionando de este modo un marcado independiente del tipo celular.

5 En una realización aún más preferida, la composición comprende de este modo al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez compuestos diferentes de la invención. En una realización aún más preferida, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o todos los compuestos de dicha composición difieren al menos en sus dominios hidrófobos.

10 Son dominios hidrófobos preferidos que son adecuados aquellos que se han definido anteriormente. Por ejemplo, una composición que comprende 5'-ColesterilTEG-ColesterilTEG-PEG2000-Fluos-3' se puede usar para el marcado celular, ya que este compuesto presenta excelentes propiedades de marcado (véase el Ejemplo 2).

15 En consecuencia, 5'-ColesterilTEG-ColesterilTEG-PEG2000-Fluos-3' es en una realización preferida uno de al menos tres compuestos marcados diferentes de la invención.

20 En una realización más preferida, un dominio hidrófobo de al menos un compuesto comprende, preferentemente consiste en, un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, especialmente ácido mirístico, ácido esteárico o ácido behénico, en particular, ácido mirístico, y/o un dominio hidrófobo de al menos un compuesto comprende, preferentemente consiste en, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α -tocoferol.

En una realización preferida, la presente divulgación se refiere a una solución acuosa que comprende uno o más compuestos de la invención.

25 La solución acuosa de la divulgación está preferentemente tamponada. Por ejemplo, una solución de la invención puede ser una solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución tamponada con Tris y/o Hepes.

30 El pH de la solución de la invención es preferentemente de aproximadamente 5,5 a 8,5, más preferentemente de 6,5 a 7,5.

Se desvela un kit que comprende al menos un compuesto o composición de la presente invención.

35 El kit puede comprender adicionalmente dos o más compuestos de la invención almacenados por separado, por ejemplo, en un recipiente o jeringa. Pueden almacenarse en forma seca, por ejemplo, secados por congelación o secos, o como solución, o en forma congelada, por ejemplo, como solución congelada.

En una realización, los compuestos de la invención pueden usarse para la detección y/o la caracterización de células raras, preferentemente para una caracterización de células raras.

40 En un uso de este tipo, las células nucleadas aisladas de sangre completa pueden inmovilizarse sobre una superficie definida usando los compuestos de la invención sobre una matriz, en particular micromatriz o nanomatriz. Las células raras dentro de esta población de células nucleadas, por ejemplo, dentro de una población de leucocitos, por ejemplo, células tumorales circulantes, células endoteliales o células epiteliales, pueden unirse cuantitativamente a esta superficie e identificarse a través de un anticuerpo o molécula de unión específica contra un antígeno o propiedad bioquímica específica para la población de células raras. Esto permite la localización exacta y la relocalización para etapas de caracterización adicionales si son necesarias.

45 Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención para una caracterización celular rara.

50 En una realización adicional, los compuestos de la invención pueden usarse para la inmovilización de células en suspensión, por ejemplo, con fines de detección, como para la detección de anticuerpos.

55 Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención para la inmovilización de células en suspensión, preferentemente para la detección, incluso más preferentemente para la detección con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno o moléculas de unión de otros formatos.

60 La detección de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en estirpes celulares de cultivo es una aplicación general en el desarrollo de anticuerpos. Una aplicación comprende la unión del anticuerpo a una molécula receptora específica sobre la superficie celular. Usando un anticuerpo secundario (efecto sándwich) pueden investigarse las características de unión del primer anticuerpo. Usando celdas de suspensión es difícil realizar dichos experimentos. Los compuestos desarrollados útiles para la inmovilización de células permiten la inmovilización cuidadosa de células en suspensión sin perder ninguna de las propiedades celulares fisiológicas y, por tanto, pueden usarse para realizar dichos ensayos de detección.

65

Además, las células en suspensión pueden inmovilizarse para ensayos de células funcionales usando los compuestos de la invención. Los ensayos que estudian la función celular in vitro o in vivo son importantes: generalmente se usan ensayos celulares funcionales en investigación y desarrollo farmacéutico, agroquímico y biotecnológico para investigar compuestos de molécula pequeña o productos biológicos o para identificar clases de moléculas pequeñas en el cribado de alto rendimiento. Algunos ensayos funcionales se basan en ensayos dependientes de la superficie y, por tanto, generalmente se realizan con células adherentes. Los compuestos de la invención pueden usarse para inmovilizar células en suspensión para aplicar dichos ensayos funcionales.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención, para realizar ensayos celulares funcionales.

Los usos de la invención son usos in vitro de los compuestos de la invención. Además, los compuestos de la invención son particularmente útiles para la unión de células vivas a una superficie sólida, seguida del desprendimiento de la superficie e implantación en modelos de ratón. Estos tipos de ensayos funcionales son de gran importancia, por ejemplo, para estudiar el potencial inductor de tumores de las células anormales circulantes.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención que unen células vivas a una superficie sólida y posterior desprendimiento.

Además, los compuestos de la invención son útiles para un laboratorio en un chip y pueden usarse para un laboratorio en un chip: para investigar la morfología celular o la función celular de pocas células como de 2 a 50 células, o células individuales, una superficie puede detectarse selectiva y sistemáticamente con un compuesto de la invención. Esta detección permite una inmovilización dirigida de pocas células o células individuales en dicho lugar. Esto permite el análisis molecular directamente sobre la superficie (chip).

Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención para un laboratorio en un chip. El chip puede ser una matriz, en particular micromatriz o nanomatriz.

En una realización adicional, la presente divulgación se refiere a un sustrato sólido que comprende un compuesto de la invención unido a un sustrato sólido.

Dicho sustrato sólido puede ser una partícula como una nanopartícula, en particular una nanopartícula magnética, una columna o un sustrato plano, una matriz o una placa de pocillos, en particular una placa de pocos o múltiples pocillos.

En una realización adicional de la presente divulgación se refiere a una matriz que comprende un compuesto de la invención unido a la matriz.

En una realización preferida, la matriz es una micromatriz o nanomatriz. Los compuestos de la invención son además útiles para la estabilización de células durante los procesos de centrifugación.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención para estabilizar al menos una célula, en particular durante la centrifugación.

Normalmente, los compuestos de la invención se añaden, por ejemplo, como solución acuosa a una suspensión celular de interés.

Normalmente, la mezcla se realiza suavemente para mantener la viabilidad de las células.

Dichas etapas de centrifugación se emplean, por ejemplo, para la separación de células de líquidos circundantes como los medios. Las células deben centrifugarse y, por tanto, se exponen a tensión de cizalla. Las poblaciones celulares muy sensibles y frágiles pueden dañarse mediante dichos procesos. Los compuestos de la invención mejoran la manipulación de dichas poblaciones celulares.

Los compuestos de la invención son además útiles para la estabilización de células en biotecnología, por ejemplo, en el cultivo de células animales a gran escala: se ha publicado que la sensibilidad a la cizalla de células de mamíferos puede ser un problema relevante que puede complicar el desarrollo del cultivo de células animales a gran escala. Los compuestos de la invención reducen estos problemas.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención para estabilizar células en cultivos de células animales a gran escala.

Los compuestos de la invención son además útiles para la estabilización de células en citometría de flujo y/o clasificación celular activada por fluorescencia

La citometría de flujo es un método utilizado muy habitualmente para separar una población celular específica. Dentro de este proceso, las células se exponen a altas tensiones de cizalla que dependen de la velocidad del flujo. Los compuestos de la invención reducen esta tensión de cizalla.

5 Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención para estabilizar células en citometría de flujo y/o clasificación celular activada por fluorescencia.

10 Los compuestos de la invención son además útiles para la estabilización de células en procesos de separación celular basados en perlas:

Las poblaciones celulares con un fenotipo distinto pueden separarse mediante anticuerpos específicos acoplados a perlas magnéticas. Dentro de este proceso, las células se exponen a altas tensiones de cizalla que dependen del tamaño de la perla. Los compuestos de la invención reducen esta tensión de cizalla.

15 Por tanto, la presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto o una composición que comprende uno o más compuestos de la invención para estabilizar células en procesos de separación celular basados en perlas.

20 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de marcado de una célula, comprendiendo el método:

- a) proporcionar un compuesto de la invención, en el que el compuesto comprende un resto marcador; y
- b) poner en contacto una célula con el compuesto en condiciones que permitan la interacción del compuesto con la membrana de la célula, inmovilizando de este modo el marcador en la célula; y
- 25 c) opcionalmente detectar el marcador.

30 Como se muestra en los ejemplos, un compuesto de la invención, en el que el compuesto comprende un resto marcador, se pone en contacto con una célula. Como el marcado se hace preferentemente con células viables o potencialmente viables, las células están normalmente presentes en una solución acuosa, que preferentemente está tamponada y/o contiene nutrientes, por ejemplo, las células se suspenden en PBS. El compuesto marcado de la invención puede añadirse a las células, por ejemplo, en forma de una solución, por ejemplo, en forma de solución acuosa mediante métodos conocidos en la técnica, como pipeteado.

35 Normalmente, el contacto tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 1 °C a 45 °C, preferentemente de 10 °C a 30 °C, más preferentemente de 22 °C a 38 °C. Además, el contacto tiene lugar a una presión de aproximadamente 900 (90 kPa) a 1100 mbar (110 kPa) para mantener la viabilidad celular.

40 Además, las células se incuban preferentemente con los compuestos durante un tiempo suficiente para permitir la unión. Normalmente, las células se incuban preferentemente con los compuestos durante 1 minuto a 3 días, preferentemente de 5 minutos a 24 h, incluso más preferentemente durante 10 minutos a 8 horas.

Además, la solución acuosa se elige normalmente para no afectar a la integridad y/o la viabilidad de una célula.

45 Dichas condiciones permiten la interacción del compuesto con la membrana de la célula. De este modo, el resto marcador se inmoviliza en la célula.

50 El resto marcador y por tanto la célula pueden detectarse como se ha descrito anteriormente, dependiendo del resto marcador elegido. En el caso de un marcador directo, la detección puede tener lugar directamente, por ejemplo, detectando la fluorescencia de la fluoresceína o la absorción de dT, como se muestra en los ejemplos.

55 En el caso de sistemas de detección indirecta, puede detectarse el segundo miembro de un par de unión. Por ejemplo, puede usarse un compuesto marcado con biotina de la invención. Para la detección, puede usarse estreptavidina, que a su vez está marcada con un marcador directamente detectable. Por tanto, la biotina puede representar un grupo de unión o un resto marcador de la invención, dependiendo de las etapas adicionales.

Para el marcado independiente de células, pueden usarse determinadas composiciones de las invenciones descritas anteriormente.

60 La divulgación se refiere adicionalmente en una realización a un método de marcado de una célula, comprendiendo el método

- a) proporcionar una composición que comprende al menos tres compuestos diferentes de la invención, en la que los compuestos diferentes difieren al menos en sus dominios hidrófobos y en la que los diferentes compuestos comprenden un resto marcador,
- 65

- b) poner en contacto una célula con la composición en condiciones que permitan la interacción del compuesto con la membrana de la célula, marcando de este modo la célula y,
- c) opcionalmente, detectar el marcador.

5 Dichas composiciones permiten el marcado independiente de células como se ha descrito anteriormente con más detalle, mediante el empleo de diferentes grupos hidrófobos.

Para este método de la divulgación, se aplican las mismas realizaciones que para el método descrito anteriormente de marcado de una célula usando compuestos de la invención.

10 Por tanto, la composición es preferentemente una solución, más preferentemente una solución acuosa que comprende los compuestos de la invención.

15 En una realización preferida, la célula es una célula en suspensión o una célula adherente y/o la célula es una célula animal o humana, en particular una célula de vertebrado, especialmente una célula de mamífero o una célula humana.

20 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de inmovilización de un grupo de unión sobre la superficie de una célula, comprendiendo el método

- a) proporcionar un compuesto de la invención, en el que el compuesto comprende un grupo de unión; y
- b) poner en contacto una célula con el compuesto en condiciones que permitan la interacción del compuesto con la membrana de la célula, inmovilizando de este modo el grupo de unión.

25 Para las etapas a) y b), se aplican las mismas realizaciones que para el marcado de células descrito anteriormente, con la excepción de que en esta realización el compuesto comprende un grupo de unión.

30 En una realización adicional más, la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, en el que el compuesto comprende un resto marcador, para el marcado de una célula.

En una realización adicional más, la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, en el que el compuesto comprende un grupo de unión, para la inmovilización de un grupo de unión sobre la superficie de la célula.

35 En una realización preferida, la célula es una célula en suspensión o una célula adherente y/o la célula es una célula animal o humana, en particular una célula de vertebrado, especialmente una célula de mamífero.

40 Con respecto a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, los expertos conocen dichas moléculas: los anticuerpos naturales son proteínas plasmáticas globulares (~150 kDa (http://en.wikipedia.org/wiki/Dalton_unit)) que también se conocen como Inmunoglobulinas que comparten una estructura básica. Como tienen cadenas de azúcares añadidas a los restos de aminoácidos, son glucoproteínas. La unidad funcional básica de cada anticuerpo es un monómero de inmunoglobulina (Ig) (que contiene solo una unidad de Ig); los anticuerpos secretados también pueden ser dímeros con dos unidades de Ig como con IgA, tetraméricos con cuatro unidades de Ig como IgM de peces teleósteos, o pentaméricos con cinco unidades de Ig, como IgM de mamíferos. En la presente invención, los ejemplos de formatos adecuados incluyen el formato de anticuerpos naturales que incluyen isotipos de anticuerpos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

Además de los anticuerpos naturales, se han desarrollado formatos de anticuerpos artificiales que incluyen fragmentos de anticuerpos. Algunos de ellos se describen a continuación.

50 Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, la propiedad única de un anticuerpo dado está determinada por las regiones variables (V), como se ha detallado anteriormente. Más específicamente, los bucles variables, tres en la cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés) y tres en la cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés), son responsables de la unión al antígeno, es decir, de su especificidad de antígeno. Estos bucles se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). Debido a que las CDR de ambos dominios VH y VL contribuyen al sitio de unión al antígeno, es la combinación de las cadenas pesada y ligera, y ninguna de ellas sola, la que determina la especificidad final del antígeno.

60 En consecuencia, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa cualquier polipéptido que tenga una similitud estructural con un anticuerpo de origen natural y es capaz de unirse específicamente a la diana respectiva, en el que la especificidad de la unión está determinada por las CDR. Por tanto, se pretende que "anticuerpo" se relacione con una estructura derivada de inmunoglobulina incluyendo la unión a la diana respectiva, pero sin limitación, un anticuerpo de longitud completa o total, un fragmento de unión a antígeno (un fragmento derivado, física o conceptualmente, de la estructura de un anticuerpo), un derivado de cualquiera de los anteriores, una molécula química, una fusión de cualquiera de los anteriores con otro polipéptido o cualquier estructura/composición alternativa que se una selectivamente a la diana respectiva. El anticuerpo o sus partes

funcionalmente activas pueden ser cualquier polipéptido que comprenda al menos un fragmento de unión a antígeno. Los fragmentos de unión al antígeno consisten en al menos el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera, dispuestos de manera que ambos dominios juntos pueden unirse al antígeno específico.

Los anticuerpos "de longitud completa" o "completos" se refieren a proteínas que comprenden dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro que comprenden: (1) en términos de cadenas pesadas, una región variable y una región constante de la cadena pesada que comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3; y (2) en términos de las cadenas ligeras, una región variable de la cadena ligera y una región constante de la cadena ligera que comprende un dominio, CL.

Los "fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno" o "fragmentos de unión a antígeno derivados del mismo" también contienen al menos un fragmento de unión a antígeno como se ha definido anteriormente y presentan esencialmente la misma función y especificidad de unión que el anticuerpo completo del que deriva la parte (o fragmento) funcionalmente activa. La digestión proteolítica limitada con papaína divide el prototipo de Ig en tres fragmentos. Dos fragmentos amino terminales idénticos, cada uno de los cuales contiene una cadena L completa y aproximadamente la mitad de una cadena H, son los fragmentos de unión al antígeno (Fab). El tercer fragmento, similar en tamaño pero que contiene la mitad carboxilo terminal de ambas cadenas pesadas con su enlace disulfuro entre cadenas, es el fragmento cristizable (Fc). El Fc contiene hidratos de carbono, enlaces de complemento y sitios de enlace de FcR. La digestión limitada con pepsina produce un único fragmento F(ab')₂ que contiene ambos trozos Fab y la región bisagra, incluyendo el enlace disulfuro intercatenario H-H. F(ab')₂ es divalente para la unión del antígeno. El enlace disulfuro de F(ab')₂ puede escindirse para obtener Fab'. Además, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera pueden fusionarse para formar un fragmento variable monocatenario (scFv).

Los dominios variables (Fv) son los fragmentos más pequeños con un dominio de unión a antígeno intacto que consiste en un VL y un VH. Dichos fragmentos, con solo los dominios de unión, pueden generarse mediante enfoques enzimáticos o la expresión de los fragmentos de genes relevantes, por ejemplo, en células bacterianas y eucariotas. Se pueden usar diferentes enfoques, por ejemplo, el fragmento Fv solo o los fragmentos 'Fab' que comprenden uno de los brazos superiores de la "Y" que incluye el Fv más los primeros dominios constantes. Estos fragmentos generalmente se estabilizan mediante la introducción de un enlace polipeptídico entre las dos cadenas lo que da como resultado la producción de un Fv monocatenario (scFv). Como alternativa, pueden usarse fragmentos Fv (dsFv) unidos por disulfuro. Los dominios de unión de los fragmentos pueden combinarse con cualquier dominio constante con el fin de producir anticuerpos de longitud completa o pueden fusionarse con otras proteínas y polipéptidos.

Un fragmento de anticuerpo recombinante es el fragmento Fv monocatenario (scFv). La disociación de scFv da como resultado scFv monoméricos, que pueden formar complejos en dímeros (diacuerpos), trímeros (triacuerpos) o añadidos más grandes, como TandAbs y Flexibodies.

Los anticuerpos con dos dominios de unión pueden crearse mediante la unión de dos scFv con un enlace polipeptídico simple (scFv)₂ o mediante la dimerización de dos monómeros (diacuerpos). Los diseños más simples son diacuerpos que tienen dos dominios funcionales de unión a antígeno que pueden ser iguales, similares (diacuerpos bivalentes) o tienen especificidad por antígenos distintos (diacuerpos biespecíficos).

Además, se han desarrollado formatos de anticuerpos que comprenden cuatro dominios variables de cadenas pesadas y cuatro dominios variables de cadenas ligeras. Los ejemplos de estos incluyen anticuerpos biespecíficos tetravalentes (TandAbs y Flexibodies, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, Alemania). Los anticuerpos flexibles son una combinación de scFv con un motivo de múltiplo de diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente con un alto grado de flexibilidad para unir dos moléculas que están muy alejadas una de otra sobre la superficie celular. Si están presentes más de dos dominios funcionales de unión a antígeno y si tienen especificidad por antígenos distintos, el anticuerpo es multiespecífico.

En resumen, los tipos de inmunoglobulina específicos que representan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen, pero no se limitan a, el siguiente anticuerpo: un Fab (fragmento monovalente con dominios ligero variable (VL), pesado variable (VH), ligero constante (CL) y pesado constante 1 (CH1)), un F(ab')₂ (fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro o una alternativa en la región bisagra), un Fv (dominios VL y VH), un scFv (una cadena simple Fv donde VL y VH se unen mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico, una molécula de anticuerpo biespecífica (una molécula de anticuerpo con especificidad como se describe en el presente documento unida a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la del anticuerpo, incluyendo, sin limitación, otro péptido o proteína como un anticuerpo o un ligando del receptor), un dímero Fv de cadena simple biespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo (un scFv unido a un CH3).

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

Un marcador es un motivo peptídico utilizado para el reconocimiento en biotecnología. Un marcador conocido es el marcador His (6xHistidina) que puede unirse a una columna de Ni²⁺.

En caso de que se use un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario como par de unión, puede usarse cualquier secuencia de ácido nucleico y su secuencia complementaria.

Las lectinas son proteínas de unión a hidratos de carbono que son altamente específicas para restos de azúcar. Como una lectina adecuada, puede usarse Concanavalina A que se une a restos de α-D-manosilo y α-D-glucosilo, estructuras α-manosídicas ramificadas (de tipo alta α-manosa o de tipo híbrido y N-glucanos de tipo complejo biantenarico).

Como par de unión receptor/ligando, por ejemplo, puede usarse receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Por ejemplo, el estrógeno puede usarse como esteroide y un receptor del mismo como compañero de unión respectivo.

Figuras

Figura 1: Placa utilizada en el experimento del Ejemplo 6: MTP tratada con estreptavidina (Microcoat), pocillo 12, NUNC, ID DE MC: 604 176, Lote N.º: 1665 C2

Figura 2: muestra el diseño del Experimento del Ejemplo 6. 4 determinaciones. Fila A: Se introdujeron 200 µl de PBS, se añadió 1 nmol de compuesto al mismo respectivamente, se mezclaron, se incubaron durante aproximadamente 30 minutos, se lavaron 2 veces con PBS, se introdujeron 800 µl de PBS, se añadieron 300.000 leucocitos (sin tratar). Fila B: se introdujeron 800 µl de PBS, se añadieron 300.000 leucocitos (sin tratar). Fila C: se incubaron 10x10⁶ leucocitos en 1 ml con 10 nmol de compuesto de la invención durante 10 minutos, se introdujeron 800 µl de PBS/pocillo, 300.000 leucocitos tratados respectivamente. La primera placa de MTP se lavó después de 30 min 2 veces con PBS, se cubrió con Höchst y se incubó durante 15 min. Se midió con > Cellavista (Operador s9s5). La segunda placa se midió después de 90 min. La tercera placa se midió después de 150 min.

Figura 3: muestra los resultados del Ejemplo 6 después de 30, 90 o 120 minutos de incubación.

Figura 4: muestra los resultados del Ejemplo 6 después de 30, 90 o 120 minutos de incubación como un gráfico.

Figura 5: muestra las placas del Ejemplo 6 después de 30, 90 o 150 minutos de incubación.

Figura 6: A: Las estructuras químicas de los compuestos de ejemplo de la invención, así como productos secundarios de síntesis. C: Síntesis de Biotina-PEG-Lys-(C18)₂, así como productos secundarios de síntesis.

Figura 7: muestra la tinción de la célula con A) compuesto que contiene colesterol con referencia interna 29.891180, B) compuesto que contiene ácido mirístico con referencia interna 29.891194. C) tinción de MDA-MB468. D) y E): tinción de células para diferentes tiempos de exposición con diferentes compuestos de la invención indicados esquemáticamente. Imágenes representativas de acuerdo con el Ejemplo 3.

Figura 8: A) y B) muestran los resultados de los experimentos de xCelligence con células Jurkat de acuerdo con el Ejemplo 3. B): 1: PBS + enlazador de biotina; 2: PBS + FCS al 10 % + enlazador de biotina; 3: PBS + FCS al 1 % + enlazador de biotina; 4: PBS sin enlazador de biotina; 5: PBS + FCS al 10 % sin enlazador de biotina; 6: PBS + FCS al 1 % sin enlazador de biotina; 7: PBS + enlazador de biotina sin SA; 8: PBS sin enlazador de biotina sin SA.

Figura 9: muestra los resultados de los experimentos de xCelligence con células leucocitarias de acuerdo con el Ejemplo 3. B): 1: PBS + enlazador de biotina; 2: PBS + FCS al 10 % + enlazador de biotina; 3: PBS + FCS al 1 % + enlazador de biotina; 4: PBS sin enlazador de biotina; 5: PBS + FCS al 10 % sin enlazador de biotina; 6: PBS + FCS al 1 % sin enlazador de biotina.

Figura 10: muestra la tinción de células inmovilizadas, de acuerdo con el Ejemplo 3. Columna izquierda: DA-MB468 - anticuerpo: K5/8. Columna central: MDA-MB468 - anticuerpo: EpCAM Miltenyi FITC. Columna derecha: MDA-MB468 anticuerpo: EGFR.

Figura 11: muestra la tinción de células inmovilizadas, de acuerdo con el Ejemplo 3. Columna izquierda: MDA-MB468 - anticuerpo: EpCAM Biolegend. Columna central: MDA-MB468 - anticuerpo: EpCAM Miltenys APC. Columna derecha: leucocitos - anticuerpo: CD45 Biolegend.

Figura 12: muestra estructuras de compuestos adicionales de la invención y compuestos de referencia, así como intermedios.

Figura 13: muestra la tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación y la inmovilización de las células usando diferentes moléculas. Las sondas moleculares HH1749*, HH1750* y HH1755* (* Biotina-PEG-Lisina-(C18)2) muestran un rendimiento diferente con respecto a la tasa de recuperación después de la centrifugación: cuanto mayor es la concentración de la molécula, mayor es la tasa de recuperación de células después de la centrifugación. Características de la centrifugación: 10 min, 300 x g.

Figura 14: muestra la tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación y la inmovilización de las células usando diferentes moléculas. Las sondas moleculares HH1749*, HH1750* y HH1755* muestran un rendimiento diferente con respecto a la tasa de inmovilización de células a diferentes concentraciones. Cuanto mayor es la concentración del compuesto, mayor es la tasa de inmovilización de células.

Figura 15: muestra la tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación usando diferentes compuestos en diferentes puntos temporales. Las moléculas A y B (A: Colesterol-TEG-Colesterol-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG; B: Biotina-PEG-Lisina-(C18)2) muestran un rendimiento diferente con respecto a la tasa de recuperación después de la centrifugación. Columna izquierda respectiva: sin compuesto de la invención; segunda columna respectiva desde la izquierda: 0,35 nmol de molécula A; tercera columna respectiva desde la izquierda: 100 nmol de molécula B; columna derecha respectiva: 0,5 nmol de molécula B. Cuanto mayor es la concentración de la molécula, mayor es la tasa de recuperación de células después de la centrifugación. La molécula B permite la inmovilización de células en 3,5 horas. Características de la centrifugación: 10 min, 300 x g.

Figura 16: muestra la tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación con diferentes experimentadores. Las columnas izquierda, media y derecha respectivas por ensayo representan los diferentes Experimentadores 1, 2 y 3. Cuanto mayor es la concentración de la molécula, mayor es la tasa de recuperación de células después de la centrifugación. Además, la estabilización de células es independiente del experimentador. Características de la centrifugación: 10 min, 300 x g. Molécula: Colesterol-TEG-Colesterol-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG.

Figura 17: muestra la tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación en diferentes puntos temporales y ajustes de centrifugación. Se sometieron a ensayo las siguientes moléculas: 1234: 5'-(colesterol-TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotina-TEG-3'; 1248: 3'-(Colesterol-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA; 1254: 3'-(Colesterol-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA; 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA. Todas las moléculas permiten la inmovilización de células en 2 horas. Los leucocitos en PBS se dañan durante la centrifugación a 300 x g durante 20 min. La molécula 1234 muestra el mejor rendimiento seguida de los compuestos 1255 y 1254. Características de la centrifugación: 20 min, 300 x g. Columna izquierda respectiva: 10 min de incubación con molécula. Columna media respectiva: 1 h min de incubación con molécula. Columna derecha respectiva: 2 h de incubación con molécula.

Figura 18: muestra la tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación en diferentes puntos temporales y ajustes de centrifugación. Se sometieron a ensayo las siguientes moléculas: 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA; 1234: 5'-(Colesterol-TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotina-TEG-3'; 1248: 3'-(Colesterol-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA; 1254: 3'-(Colesterol-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA. Todas las moléculas permiten la inmovilización de células en 2 horas. Los leucocitos en PBS se dañan durante la centrifugación a 500 x g durante 20 min. La molécula 1234 muestra el mejor rendimiento seguida de las moléculas 1255 y 1254. Características de la centrifugación: 20 min, 500 x g. Columna izquierda respectiva: 10 min de incubación con molécula. Columna media respectiva: 1 h min de incubación con molécula. Columna derecha respectiva: 3 h de incubación con molécula.

Figura 19: muestra la tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación en diferentes puntos temporales y ajustes de centrifugación. Se sometieron a ensayo las siguientes moléculas: 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA; 1234: 5'-(Colesterol-TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotina-TEG-3'; 1248: 3'-(Colesterol-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA; 1254: 3'-(Colesterol-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA. Todas las moléculas permiten la inmovilización de células en 2 horas. Los leucocitos en PBS se dañan durante la centrifugación a 1000 x g durante 20 min. Características de la centrifugación: 20 min, 1000 x g. Columna izquierda respectiva: 10 min de incubación con molécula. Columna media respectiva: 1 h min de incubación con molécula. Columna derecha respectiva: 2 h de incubación con molécula.

Figura 20: muestra la tasa de recuperación de células Jurkat después de la centrifugación en diferentes puntos temporales. Columnas respectivas desde la izquierda: 1: 10 min de incubación con molécula. 2: 1 h de incubación con molécula. 3: 3,5 h de incubación con molécula. 4: 5,5 h min de incubación con molécula. Se analizaron las siguientes moléculas: 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000dT-Biotina-TEG-5' INVERSA. 1234: 5'-(Colesteril-TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotina-TEG-3'; 1248: 3'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA; 1254: 3'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA. Las células de cultivo Jurkat son estables durante los procesos de centrifugación en PBS y así como usando diferentes moléculas en 5,5 h. Características de la centrifugación: 20 min, 500 x g.

Figura 21: muestra que los restos enlazadores trifuncionales no influyen en la viabilidad celular. Se realizó un ensayo de viabilidad celular usando el kit de proliferación WST-1 (RAS), empleando diferentes moléculas de la invención que difieren en los restos enlazadores trifuncionales. Los diferentes enlazadores parecen no influir en la viabilidad celular durante el tiempo de incubación del enlazador de 4 horas. Ensayo de viabilidad después de A) 2 horas y B) 4 horas.

Figura 22: muestra que los restos enlazadores trifuncionales no influyen en la viabilidad celular. Se descubrió que las moléculas sometidas a ensayo de la invención, en concreto A): N.º 1244 como compuesto con resto de colesterol y B): 1274 como compuesto con resto de ácido esteárico, no influyen en la morfología celular durante el tiempo de incubación del enlazador de 4,5 horas. Imágenes a la izquierda: 1 h de incubación. Imágenes intermedias: 2,5 h de incubación. Imágenes a la derecha: 4,5 h de incubación. Imágenes superiores: Brightfield. Imágenes inferiores: DAPI.

Figura 23: muestra la morfología celular sin incubación del enlazador en diferentes puntos temporales. Sin la adición de la molécula de la invención, las células difunden durante un tiempo de incubación de 4,5 horas. La morfología celular no se ve influenciada en las células de la izquierda durante el tiempo de incubación. Imágenes a la izquierda: 1 h de incubación. Imágenes intermedias: 2,5 h de incubación. Imágenes a la derecha: 4,5 h de incubación. Imágenes superiores: Brightfield. Imágenes inferiores: DAPI.

Figura 24: muestra la tasa de recuperación de células MDA-MB468 después de la centrifugación en diferentes puntos temporales. Columnas respectivas desde la izquierda: 1: 10 min de incubación con molécula. 2: 1 h de incubación con molécula. 3: 3 h de incubación con molécula. 4: 5 h min de incubación con molécula. Se sometieron a ensayo los siguientes compuestos de la invención: 1234: 5'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-dT-Biotina-TEG-3'; 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA. Las células de cultivo MDA-MB468 son estables durante los procesos de centrifugación en PBS, así como usando diferentes moléculas de la invención en 5 h. Características de la centrifugación: 20 min, 500 x g.

Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos de la invención

Se sintetizaron los siguientes compuestos de la invención:

<u>N.º interno</u>	<u>Escala</u>	<u>Estructura química</u>	<u>Rendimiento</u>
BMO 29.891131	Escala 10 µMol	5'-alfaTocoferoITEG-PEG2000-Fluos-3'	58 pMol/µl-234 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891132	Escala 10 µMol	5'-Colesterol-TEG-PEG2000-Fluos-3'	61 pMol/µl-216 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891133	Escala 10 µMol	5'-Colesterol-TEG-PEG2000-Fluos-3'	43 pMol/µl-153 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891137	Escala 10 µMol	5'-Colesterol-TEG-PEG2000-Biotin TEG-3'	111 pMol/µl-200 nMol
Síntesis-DMTrDESACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891180	Escala 10 µMol	5'-Colesterol-TEG-PEG2000-Fluos-Biotin TEG-3'	3577 pMol/µl-6440 nMol
Síntesis-DMTrDESACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891194_Ch01	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-Ácido mirístico-PEG2000-Fluos-Biotin TEG-3'	10 pMol/µl-12 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=10 min-3=2x8 min-4+5=10 min/			
TEA+/Conc.-Fluos			
BMO 29.891194_Ch02	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-Ácido mirístico-PEG2000-Fluos-Biotin TEG-3'	22 pMol/µl-24 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=10 min-3=2x8 min-4+5=15 min/			
TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos			
BMO 29.891194_Ch03	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-Ácido mirístico-PEG2000-Fluos-Biotin TEG-3'	11 pMol/µl-11 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891197	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-EspaciadorC9-Ácido mirístico-PEG2000-Fluos-Biotin TEG-3'	0,5 pMol/µl-0,7 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891213_Ch01	Escala 10 µMol	5'-Ácido mirístico-EspaciadorC18-Fluos-Biotin TEG-3'	538 pMol/µl-808 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/todo 120 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891213_Ch02	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-EspaciadorC18-Fluos-Biotin TEG-3'	613 pMol/µl-919 nMol
Purificación-T2-C18/T2=F73-99-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos			
BMO 29.891214	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotin TEG-3'	100 pMol/µl-100 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/todo 10 min. Acoplamiento/			
BMO 29.891218	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-EspaciadorC9-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotin TEG-3'	40 pMol/µl-44 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/			
TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos			
BMO 29.891219	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-EspaciadorC12-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotin TEG-3'	15 pMol/µl-22 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/			
TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos			
BMO 29.891220	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-EspaciadorC18-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotin TEG-3'	56 pMol/µl-79 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/			
TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos			
BMO 29.891221	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotin TEG-3'	38 pMol/µl-42 nMol

<u>N.º interno</u>	<u>Escala</u>	<u>Estructura química</u>	<u>Rendimiento</u>
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C18/F32-41-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos BMO 29.891222_Ch03	Escala 1 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinTEG-3'	12 pMol/µl-14 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=2X10 min-3-9=5 min-10-12=2X10 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C8/F69-73-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos BMO 29.891222_Ch04	Escala 1 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinTEG-3'	6 pMol/µl-7 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=2X15 min-3-9=5 min-10-12=2X15 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C4/F10-13-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos BMO 29.891222_Ch05	Escala 1 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinTEG-3'	13 pMol/µl-17 nMol
Síntesis-DMTrDESACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=2X15 min-3-9=5 min-10-12=2X15 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C4/F60-64-TEA+/evaporar/Conc.-Fluos BMO 29.891224	Escala 1 µMol	5'-ColesterilITEG-EspaciadorC12-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinTEG-3'	74 pMol/µl-81 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C18/F26-33-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos BMO 29.891225	Escala 1 µMol	5'-ColesterilITEG-EspaciadorC18-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinTEG-3'	5 pMol/µl-6 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C18/F14-19-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos BMO 29.891227	Escala 1 µMol	5'-Ácido mirístico-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinTEG-3'	20 pMol/µl-21 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C18/F34-40-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos BMO 29.891228_Ch02	Escala 1 µMol	5'-ColesterilITEG-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-BiotinTEG-3'	9 pMol/µl-11 nMol
Síntesis-DMTrACTIVADO/Acoplamiento: 1+2=20 min-3-9=5 min-10-12=20 min/Escisión-CPG-Convenccional/Purificación-C18/F28-31-TEA+/evaporar/DMTrDESACTIVADO/Conc.-Fluos BMO 29.891234_Ch03	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	239 pMol/µl-358 nMol
Síntesis-DMTrDESACTIVADO-CPG-Universal-1000A/Acoplamiento: 1=20 min-3-8=5 min-9-11=20 min/Escisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-C8/F65-70-TEA+/evaporar/Conc. 260 nm BMO 29.891234_Ch04	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	204 pMol/µl-307 nMol

<u>N.º interno</u>	<u>Escala</u>	<u>Estructura química</u>	<u>Rendimiento</u>
<i>Síntesis-DMTrDESACTIVADO-PS-Universal/Acoplamiento: 1=20 min-3-8=5 min-9-11=20 min/Excisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-C8/F83-88-TEA+levaporar/Conc. 260 nm</i>			
BMO 29.891234_ Ch07	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)9bis10-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	277 pMol/µl-415 nMol
<i>Síntesis-DMTrDESACTIVADO-PS-Universal+Hyazinthactivator/EspaciadorC18=0,2 M/Acoplamiento: 1+2=3 min-3=2x5 min-4-11=3 min/Excisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-C8/F55-59-Na+Vivaspín 2.000/Conc. 260 nm</i>			
BMO 29.891234_ Ch08	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)9bis10-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	306 pMol/µl-406 nMol
<i>Síntesis-DMTrDESACTIVADO-PS-Universal+Hyazinthactivator/EspaciadorC18=0,2 M/Acoplamiento: 1+2=3 min-3=2x5 min-4-11=3 min/Excisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-C8/F37-41-Na+Vivaspín 2.000/Conc. 260 nm</i>			
BMO 29.891234_ Ch09	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	Véase a continuación
<i>Síntesis-DMTrDESACTIVADO-CPG-Universal-1000A+Hyazinthactivator/EspaciadorC18=0,2 M/Acoplamiento: 1+2=3 min-3+4=2x10 min-5-10=10 min-11+12=3 min/Excisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-en bruto y C8/F=véase a continuación/Vivaspín 2.000/Conc. 260 nm</i>			
	T1_en bruto		1.356 pMol/µl- 2.033 nMol
	T2_en bruto_Na		1.165 pMol/µl- 1.747 nMol
	T3_F38-40		53 pMol/µl-80 nMol
	T3_F38-40_Na		51 pMol/µl-77 nMol
BMO 29.891236_ Ch10	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	Véase a continuación
<i>Síntesis-DMTrDESACTIVADO-CPG-Universal-1000A+Hyazinthactivator/EspaciadorC18=0,2 M/Acoplamiento: 1+2=3 min-3+4=2x10 min-5-10=10 min-11+12=3 min/Excisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-EN BRUTO y C8/F=véase a continuación/Vivaspín 2.000/Conc. 260 nm</i>			
	T1_en bruto		2.430 pMol/µl- 3.645 nMol
	T2_F37-39_Na		227 pMol/µl-341 nMol
BMO 29.891237_ Ch11	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	Véase a continuación
<i>Síntesis-DMTrDESACTIVADO-CPG-dT-2000A/EspaciadorC18=0,2 M/Acoplamiento: 1+2=20 min-3+4=2x10 min-5-10=10 min-11+12=20 min/Excisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-EN BRUTO y C8/F=véase a continuación/Vivaspín 2.000/Conc. 260 nm</i>			
	F42-45_Na		166 pMol/µl-248 nMol
	F47-49_Na		100 pMol/µl-150 nMol
BMO 29.891237_ Ch12	Escala 10 µMol	5'-ColesterilITEG-ColesterilITEG-(EspaciadorC18)7-dT(Determ. de concentración)-BiotinTEG-3'	Véase a continuación

<u>N.º interno</u>	<u>Escala</u>	<u>Estructura química</u>	<u>Rendimiento</u>
Síntesis-DMT-DESACTIVADO-CPG-dT-2000A/EspaciadorC18=0,2 M/Acoplamiento: 1+2=20 min-3+4=2x10 min-5-10=10 min-11+12=20 min/Excisión-CPG=NH3-Isoprop/Purificación-EN BRUTO y C8/F=véase a continuación/Vivaspín 2.000/Conc. 260 nm	F51-53_Na F56-59_Na		216 pMol/µl-324 nMol 160 pMol/µl-250 nMol

Síntesis de ejemplo realizadas y resultados de las mismas:

A)

DK1194ChO 2	Escala 1 µMol	5'- Ácido mirístico	Ácido mirístico	PEG-2000	6CarboxiFluos	Biotina- TEG	-3'	11 pMol/ µl	Sintetizado y determinado
DK1197	Escala 1 µMol	Ácido mirístico 5'- EspaciadorC9	Ácido mirístico	PEG-2000	6CarboxiFluos	Biotina- TEG	-3'	0,5 pMol/ µl	Sintetizado y determinado
DK1213	Escala 10 µMol	5'- Ácido mirístico	Ácido mirístico	Espaciador C18	6CarboxiFluos	Biotina- TEG	-3'	538 pMol/ µl	2 cargas sintetizadas y determinadas
DK1214	Escala 1 µMol	5'- Ácido mirístico	Ácido mirístico	(Espaciador C18) x7	6CarboxiFluos	Biotina- TEG	-3'	100 pMol/ µl	Sintetizado y determinado

	5'-	ColesterilTEG	EspaciadorC18	Ácido mirístico	(EspaciadorC18) x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'
	CPG	11	columnas					
DK1193	Biotina-TEG	11	0,1 M	0,5 g		4,50 ml de ACN		
	Acido mirístico			1x0,25 g+1x100 µMol a 11+4				
10-1975	ColesterilTEG	13	0,1 M	Acoplamiento µMol a 11+4		3,10 ml de ACN		
				1x0,25 g+1x100 Acoplamiento µMol a 11+4				
10-1964	6CarboxiFluos	11	0,1 M			3,20 ml de ACN		
10-1909	EspaciadorC9	2	0,1 M	1x100 µMol		1,00 ml de ACN		
10-1928	EspaciadorC12	2	0,1 M	1x100 µMol		1,00 ml de ACN		
10-1918	EspaciadorC18	79	0,1 M	5x0,25 g a 18 Acoplamiento		16,00 ml de ACN		

C)

Escala	DK1213	10 µMol	5'-	Ácido mirístico	Ácido mirístico	EspaciadorC18	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	538 pMol/µl	y	2 Cargas sintetizadas
												determinadas Sintetizado
Escala	DK1214	1 µMol	5'-	Ácido mirístico	Ácido mirístico	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	100 pMol/µl	y	determinado
Escala	DK1218	1 µMol	5'-	Ácido mirístico	Ácido mirístico	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	40 pMol/µl		
Escala	DK1219	1 µMol	5'-	Ácido mirístico	Ácido mirístico	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	15 pMol/µl		
Escala	DK1220	1 µMol	5'-	Ácido mirístico	Ácido mirístico	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	56 pMol/µl		
Escala	DK1221	1 µMol	5'-	Ácido mirístico	Ácido mirístico	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	38 pMol/µl		
Escala	DK1222	1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	12 + 6 + 13 pMol/µl		
Escala	DK1223	1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	Difficultades de síntesis		
Escala	DK1224	1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	74 pMol/µl		
Escala	DK1225	1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	5 pMol/µl		
Escala	DK1226	1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	Difficultades de síntesis		
Escala	DK1227	1 µMol	5'-	Ácido mirístico	Ácido mirístico	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	20 pMol/µl		
Escala	DK1228	1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	9 pMol/µl		
Escala	DK1229	1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	EspaciadorC3	Colesteril-TEG	(EspaciadorC3)x7	-3'	6CarboxiFluos		
Escala		1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	Sin síntesis		
Escala		1 µMol	5'-	Colesteril-TEG	Colesteril-TEG	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	Sin síntesis		

Escala	Colesterol-	EspaciadorC18	Ácido mirístico	(EspaciadorC18)x7	6CarboxiFluos	Biotina-TEG	-3'	Sin síntesis
1 µMol	5'- TEG	Colesterol-	Colesterol-	(EspaciadorC18)x7	dT (determinac.			239+307 pMol/
Escala		TEG	TEG	(EspaciadorC18)x7	de la conc.)	Biotina-TEG	-3'	µl
DK1234	10 µMol	5'-						

D) Estructuras químicas de compuestos de ejemplo de la invención, así como de productos secundarios.

Las estructuras químicas de los compuestos de ejemplo de la invención, así como de los productos secundarios de síntesis, se representan en la Figura 6 A y B.

E) Síntesis de Biotina-PEG-Lys-(C18)₂

La síntesis de Biotina-PEG-Lys-(C18)₂ de la invención se muestra en la Figura 6C.

F) Estructuras de compuestos de la invención adicionales y compuestos de referencia, así como de intermedios de los mismos

Para la síntesis de compuestos de la invención y compuestos de referencia, se usaron los siguientes intermedios:

colestiril-TEG-CE-PA (GlenResearch 10-1975),
 ácido mirístico-CE-PA (producción en laboratorio),
 biotina-TEG-CE-PA (GlenResearch 10-1955),
 biotina-dT-CE-PA (GlenResearch 10-1038),
 dT-CE-PA (GlenResearch 10-1030),
 doblador simétrico-CE-PA (GlenResearch 10-1920),
 PEG-200-CED-PA (ChemGenes CLP-2119),
 6-Fluoresceína-CE-PA (GlenResearch 10-1964) y
 universal-CPG (Proligo 1000A M401010).

Se muestran estructuras de compuestos de la invención adicionales y compuestos de referencia, así como de intermedios en la Figura 12.

2. Marcado de células usando compuestos de la invención y compuestos de referencia

GLÓBULOS BLANCOS: leucocitos

	Linol (perclorato de 1,1'-dilinoil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina, Invitrogen)	Oleilo (NOFBAM)	PKH26 (ácido mirístico, ácido behénico; SIGMA)	PKH67 (SIGMA)	PKH2 (SIGMA)	Fosfatidil-etanolamina (N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propiol)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio, Invitrogen)	Esfingomielina (N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-pentanoil)esfingosil-fosfocolina; Invitrogen)
Leucocitos	es captado por la mayor parte de las células (más en comparación con otras moléculas (tiempo de exposición: 20-50 ms) ✓	no es captado por todas las células (granulocitos potencialmente negativos) ✓	Tiñe granulocitos y casi todas las demás células sanguíneas (1 Ej: 3 células no teñidas) V	Tiñe casi todas las células; aparentemente ningún monocito, combinación de linol y otras células PKH67- todas las células teñidas V	no tiñe todas las células, mejor ✓	X	(x) - muy mal
U937	✓		✓				
MDA-MB468	✓	✓ no todos	✓				
Jurkat	✓	✓	✓			X	X
CHO	✓		✓			X	X muy débil
COS 7	✓		✓			X	X
Hela	✓		✓*			x/✓ muy débil	✓
NIH 3T3	✓		✓			X	X
Células epiteliales	✓	✓	V no todas las	✓	✓ no todas	X	✓

* una célula teñida débilmente

	BMO 29.891133 ID: 3882 5'-XXYZ-3' X = Colesteril-TEG Y = PEG2000 Z = Fluos	BMO: 29.891132 ID: 3880 5'-XYZ-3' X = Colesteril-TEG Y = PEG2000 Z = Fluos	BMO: 29.891131 ID: 3879 5'-XYZ-3' X = a-Tocoferol-TEG Y = PEG2000 Z = Fluos	Perclorato de 1,1'- Dioctadecil-3,3',3',3'- tetrametilindocarbocianina Sigma 42364-100 mg	BMO: 15.000078 Acido sulfo- JA133- fenilborónico
Leucocitos	X	✓ no todas	✓ no todas	✓ no todas	✓
U937	✓	✓	✓	✓	
MDA MB468	✓	✓	✓	✓	
Jurkat	✓			✓	
CHO	✓			✓	
COS 7	✓			✓	
Hela	✓			✓	
NIH 3T3	✓			✓*	
Células epiteliales	✓	✓	✓	✓	✓
* una célula sin teñir					

Ejemplo 3: Resultados de experimentos relacionados con la inmovilización de células

Lo siguiente se aplica para la descripción modular de los compuestos a continuación:

X = resto hidrófobo, Y = PEG2000, Z = Biotina-TEG, F = Fluos = fluoresceína

5 En el siguiente experimento, se determinó la tasa de recuperación de células.

A)

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
Sunbright(OE-080CS)DADOO-Biotina		15.260250			
BAM-SH		15.260254	28,0 %	leucocitos	
Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-PEG2000-Biotina-TEG	5'-XXYZ-3'	29.891137	77,1 %	leucocitos	
Biotina-PEG2000-ácido borónico		15.260267	16,3 %	leucocitos	
Colesteril-TEG-colesterilo-TEG-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG	5'-XXYZ-3'	29.891180	71 - 90 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			77,7 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			62,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			95,8 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			77,9 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			88,5 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			69,7 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			79,2 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			72,5 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
1,2 Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-biotinil(PEG2000)	DSPE-PEG(2000) Biotina (Avantilipids)		54-83 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Ácido mirístico-ácido mirístico-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG	5'-XXYZ-3'	29.891194	21-26 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
biotina-PEG-lys-(C14)2		15.260268	52-86 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Ácido mirístico-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG	5'-XXXXXXXXXXYZ-3' (Y = Espaciador)	29.891214	78,9 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			68,7 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			90,5 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			81,1 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			65,9 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			84,9 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
Ácido mirístico-Ácido mirístico-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG	5'-XXYFZ-3' (Y = Espaciador)	29.891213	85,1 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			67,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			61,9 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			80,2 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			70,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Ácido mirístico-EspaciadorC9-Ácido mirístico-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG	5'-XSXYFZ-3' (S = Espaciador)	29.891197	material insuficiente; la tinción no es buena	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Ácido mirístico-Ácido mirístico-EspaciadorC9-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG	5'-XYXYXYXYXYFZ-3' (Y = Espaciador)	29.891218	50,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			55,1 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Ácido mirístico-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG	5'-XEYXYXYXYXYFF-3' (Y = Espaciador; X = Mir.; E = Col.)	29.891227	64,9 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			69,6 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			77,8 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			77,8 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
(Ácido mirístico)3-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG	5'-XXXXYXYXYXYFZ-3' (Y = Espaciador)	29.891221	46,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			79,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			68,8 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			76,5 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			83,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Ácido mirístico-EspaciadorC12-Ácido mirístico-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG	5'-XVXYXYXYXYFY-3' (N = Espaciador C12, Y = Espaciador C18)	29.891219	46,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			39,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
			53,7 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			56,6 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Acido mirístico-Espaciador C18-					
Acido mirístico-(EspaciadorC18)7-	5'-XXYYYYYYYFZ-3' (Y =	29.891220	35,8 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Fluos-Biotina-TEG	Espaciador C18)				
			41,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			55,9 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			63,5%	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-					
(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-	5'-XXYYYYYYYFZ-3' (Y =	29.891222	52,6 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
TEG	Espaciador C18)				
			76,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			80,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			70,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			71,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			80,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			4,1 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			38,8 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			13,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células Sin diluir
			11,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células Diluido 1:1
			77,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células Sin diluir
			79,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células Diluido 1:1
			23,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células Sin tratar
			17,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células US + 10' 98 °C
			68,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células Sin tratar
			61,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células US + 10' 98 °C
Colesteril-TEG-EspaciadorC12-	5'-XWXYYYYFY-3' (W =	29.891224	119,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-	Espaciador C12, Y =				
Fluos-Biotina-TEG	Espaciador C18)				

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
			60,6 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			64,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			70,3 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			78,1 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Colesterol-TEG-EspaciadorC18-Colesterol-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG	5'-XXXXXXXXXXFF-3' (Y = EspaciadorC18)	29.891225	38,8 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			46,5 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Colesterol-Ácido mirístico-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG	5'-EXXXXXXXXXFY-3' (Y = Espaciador, X = Mir., E = Col.)	29.891228	76,1 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			64,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			17,4 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			52,1 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
Colesterol-TEG-Colesterol-TEG-(EspaciadorC18)7-Biotina-TEG	5'-XXXXXXXXXXTZ-3' (Y = Espaciador C18)	29.891234	9,6 %	leucocitos	10 pmol/10e6 células
			18,8 %	leucocitos	100 pmol/10e6 células
			24,9 %	leucocitos	500 pmol/10e6 células
			35,4 %	leucocitos	1000 pmol/10e6 células
			12,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			22,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			17,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			27,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			10,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			12,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			22,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			22,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			12,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			14,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración	
			13,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween21 al 0,000003 %
			11,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween22 al 0,0 %
			26,8 %	leucocitos	300 pmol/10e6 células	
			41,7 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células	
			99,7 %	leucocitos	10 nmol/10e6 células	
			36,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Sin diluir
			25,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Diluido 1:1
			13,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Sin tratar
			23,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	US + 10' 98 °C
			15,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween20 al 0,001 %
			18,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween20 al 0,0003 %
			28,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween21 al 0,0001 %
			36,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween22 al 0,00003 %
			20,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween20 al 0,00003 %
			23,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween20 al 0,00001 %
			25,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween21 al 0,000003 %
			35,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween22 al 0,0 %
Biotina-PEG-Lisina-C18 (ácido esteárico)		15.260271	21,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	tampoco mejor a concentraciones más altas
Biotina-PEG Lisina-C22 (ácido behénico)			27,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	tampoco mejor a concentraciones más altas
Biotina-PEG-Lisina-(C18)2 disuelta en			4,8 %	leucocitos	10 pmol/10e6 células	
			6,8 %	leucocitos	100 pmol/10e6 células	
			21,8 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células	
			60,6 %	leucocitos	10 nmol/10e6 células	
			43,0 %	leucocitos	10 nmol/10e6 células	

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración	
			69,0 %	leucocitos	50 nmol/10e6 células	
			81,8 %	leucocitos	100 nmol/10e6 células	
			29,6 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células	
			68,5 %	leucocitos	10 nmol/10e6 células	
			83,9 %	leucocitos	100 nmol/10e6 células	
			9,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween20 al 0,001 %
			10,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween20 al 0,0003 %
			10,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween21 al 0,0001 %
			15,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	Tween22 al 0,00003 %
			75,0 %	leucocitos	100 nmol/10e6 células	
			44,0 %	leucocitos	5 nmol/10e6 células	
			25,0 %	leucocitos	0,5 nmol/10e6 células	
			66,0 %	leucocitos	100 nmol/10e6 células	
			34,0 %	leucocitos	5 nmol/10e6 células	
			27,0 %	leucocitos	0,5 nmol/10e6 células	
						puede ser debido a la exposición de 1,5-2 h de la placa
			33,0 %	leucocitos	100 nmol/10e6 células	
			16,0 %	leucocitos	5 nmol/10e6 células	
			38,0 %	leucocitos	0,5 nmol/10e6 células	
Colesteril-TEG-Colesteril-TEG- (EspaciadorC18)7-Biotina-TEG	5'-XXYYYYYYTZ-3' (Y = EspaciadorC18)	29.891234	18,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	no se evaporó, centrifugado VIVA
			42,0 %	leucocitos	1000 pmol/10e6 células	no se evaporó, centrifugado VIVA
de colessterilo-TEG-Colesteril-TEG- (EspaciadorC8)	7-Biotina-TEG- 5'-XXYYYYYYTZ-3' (Y = EspaciadorC18)	29.891234	19,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células	no se evaporó, centrifugado VIVA
			45,0 %	leucocitos	1000 pmol/10e6 células	no se evaporó, centrifugado VIVA

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
5'-(Colesterol-TEG)2-(EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (X = EspaciadorC18)	29.891234	7,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			13,0 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
5'-(Colesterol-TEG)2-(EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (X = EspaciadorC18)	29.891234	63,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			71,0 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
5'-(colesteryl-TEG)2-(EspaciadorC18)7-dT-biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (x = EspaciadorC18)	29.891234	52,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			78,0 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
5'-(Colesterol-TEG)2-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29.891234	33,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			44,0 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
5'-(Colesterol-TEG)2-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29.891236	46,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			64,0 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
5'-(colesteryl-TEG)2-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29.891236	37,0 %	leucocitos	350 pmol/10e6 células
			47,0 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
5'-(colesteryl-TEG)2-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29.891237	8,1 %	leucocitos	10 pmol/10e6 células
			15,1 %	leucocitos	100 pmol/10e6 células
			41,3 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
			59,1 %	leucocitos	10 nmol/10e6 células
5'-(Colesterol-TEG)2-(EspaciadorC18)7-EspaciadorC3-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = EspaciadorC3, X = EspaciadorC18)	29.891237	10,5 %	leucocitos	10 pmol/10e6 células
			16,4 %	leucocitos	100 pmol/10e6 células

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
			35,4 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
			62,0 %	leucocitos	10 nmol/10e6 células
5'-(Colesteril-TEG)- (EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-Y XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = Espaciador C18)	29.891244	14,00 %	leucocitos	10 pmol/10e6 células
			27,00 %	leucocitos	100 pmol/10e6 células
			51,00 %	leucocitos	1 nmol/10e6 células
			57,00 %	leucocitos	10 nmol/10e6 células
5'-(Colesteril-TEG)2- (EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = EspaciadorC3, X = EspaciadorC18)	29.891246	9,50 %		10 pmol/10e6 células
			20,50 %		100 pmol/10e6 células
			50,70 %		1 nmol/10e6 células
			68,90 %		10 nmol/10e6 células
5'-(EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29.891245	9,30 %		10 pmol/10e6 células
			6,20 %		100 pmol/10e6 células
			8,40 %		1 nmol/10e6 células
			27,50 %		10 nmol/10e6 células
5'-(Colesteril-TEG)2- (EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = Espaciador C18)	29.891246	74,50 %		10 nmol/10e6 células
5'-(Colesteril-TEG)- (EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-Y XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = Espaciador C18)	29.891244	51,70 %		10 nmol/10e6 células
5'-(EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29.891245	24,70 %		10 nmol/10e6 células
Mezcla de 44 + 45+ 46			66,90 %		10 nmol/10e6 células
5'-(Colesterilo-TEG)2- (EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXXTZ-3' (W = EspaciadorC3, X = EspaciadorC18)	29.891246	87,16 %		10 nmol/10e6 células

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
5'-(Colesterilo-TEG)-(EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-Y XXXXXXXTZ-3' (W = EspaciadorC3, X = EspaciadorC18)	29.891244	63,70 % 26,50 %		10 nmol/10e6 células
5'-(EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-XXXXXXXXTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29.891245			10 nmol/10e6 células
Mezcla de 44 + 45 + 46			79,46 %		10 nmol/10e6 células
5'-(EspaciadorC18)-dT-Biotina-TEG-3'	5'-XTZ-3' (W = Espaciador C3, X = EspaciadorC18)	29891240	12,80 % 14,90 %		1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células
5'-(Colesteril-TEG)2-(EspaciadorC18)7-dT-Biotina-TEG-3'	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W = EspaciadorC3, X = EspaciadorC18)	29.891246	85,50 %		1C18 1 nmol + ColCol 10 nmol
Mezcla			83,22 %		1C18 10 nmol + ColCol 10 nmol
1,2 Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[biotinil(PEG2000)]	DSPE-PEG (2000) Biotina (Avantilipids)		70,80 %		Diestearina 10 nmol/10 ⁶ sin EDTA-K
			71,60 % 76,50 % 72,00 %		Diestearina 10 nmol/10 ⁶ EDTA-K 0,3 mM Diestearina 10 nmol/10 ⁶ EDTA-K 1 mM Diestearina 10 nmol/10 ⁶ EDTA-K 3 mM
			78,30 % 82,70 % 88,50 % 81,80 %		Diestearina 10 nmol/10 ⁶ sin EDTA-K Diestearina 10 nmol/10 ⁶ EDTA-K 0,3 mM Diestearina 10 nmol/10 ⁶ EDTA-K 1 mM Diestearina 10 nmol/10 ⁶ EDTA-K 3 mM
			68,90 % 69,60 % 68,90 % 95,90 %		10 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células
			84,40 % 90,80 %		10 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células
1,2-Dioleil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamin-N-(Cap-Biotin)-Na	Avantilipids		66,30 % 91,10 % 95,80 % 20,60 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células Sin enlazador

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
			74,40 % 107,10 % 101,76 % 26,85 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células Sin enlazador
			81,00 % 80,10 % 64,90 % 80,55 % 70,85 % 80,74 %		100 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células
			53,97 % 69,60 % 80,16 % 95,94 %		100 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 500 pmol/10e6 células 500 pmol/10e6 células
			89,19 % 105,12 %		10 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células
Dipalmitil-sn-Glicerol-3-Fosfoetanolamina-N-(Cap-Biotin)-Na	Avantilipids		54,30 % 72,20 % 84,90 % 11,10 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células sin enlazador
			45,40 % 86,10 % 89,30 % 14,10 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células sin enlazador
			51,80 % 55,90 % 52,60 % 73,07 % 61,27 % 71,40 %		300 pmol/10e6 células 300 pmol/10e6 células 300 pmol/10e6 células 300 pmol/10e6 células 300 pmol/10e6 células 300 pmol/10e6 células
5'-(Cholesterol-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina_TEG-3'	purificada	29.891.24 7	13,38 % 15,26 % 13,27 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células
			45,75 %		10 nmol/10e6 células

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración	
5'-(Colesteril-TEG)2-Espaciador C18-Fluos-Biotin_TEG-3'	purificado	29.891251	25,57 % 57,82 % 89,71 % 92,63 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	
			68,57 % 82,61 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
5'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000- Fluos-Biotin_TEG-3' INVERSA	purificado	29.891248	32,80 % 65,36 % 83,99 % 81,10 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	
			70,75 % 86,03 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
5'-(Colesteril-TEG)2-Espaciador C18-Fluos-Biotin_TEG-3' INVERSA	purificado	29.891254	40,30 % 64,60 % 92,50 % 83,60 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 Células	
			57,63 %		100 pmol/10e6 células	
			82,19 %		1 nmol/10e6 células	
			65,69 % 81,79 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
			70,07 %		100 pmol/10e6 células	
			81,28 % 74,68 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
3'-(Acido mirístico)2-PEG2000-dT- Biotina-TEG-5' INVERSA	sin purificar	29.891255	24,70 % 50,61 % 87,55 % 83,53 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	
3'-(Acido mirístico)2-PEG2000- Fluos-Biotin-TEG-5' INVERSA	sin purificar	29.891256	35,79 % 73,42 % 85,13 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración	
5'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-dT-Biotina_TEG-3'	sin purificar	29.891249	11,38 % 16,16 % 37,73 % 61,04 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	
5'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-dT-Biotina_TEG-3' INVERSA	sin purificar	29.891252	28,56 % 55,41 % 71,99 % 88,05 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	
			16,03 % 52,46 % 80,83 % 85,47 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	
5'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC12-dT-Biotina_TEG-3' INVERSA	sin purificar	29.891253	47,42 % 73,46 % 96,84 % 102,36 %		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	
			41,44 % 72,13 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
			62,59 % 79,02 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
5'-(Col-TEG)1-Doblador-dT-Biotina-3'		29.891272	65,03 % 83,08 % 87,93 % Cél. lisadas		10 pmol/10e6 células 100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células 10 nmol/10e6 células	Formación de vesícula
			56,49 %		100 pmol/10e6 células	
			72,13 %		1 nmol/10e6 células	
			62,11 % 82,47 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
			82,01 %		100 pmol/10e6 células	
5'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-dT-Biotina_TEG-3'	purificada	29.891249	50,49 % 87,24 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	
5'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina_TEG-3' INVERSA	purificado	29.891250	48,66 % 81,29 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células	

Compuesto sometido a ensayo	Estructura modular	Número de referencia interno	Tasa de recuperación	Células	Concentración
5'-(Colesteril-TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotin TEG-3'INVERSA	purificado	29.891252	28,18 % 61,88 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células
5'-(Colesteril-TEG) 2-EspaciadorC 12-dTBiotina_TEG-3' INVERSA	purificados	29.891253	71,41 % 86,21 %		100 pmol/10e6 células 1 nmol/10e6 células

B)

Molécula/ combinación de las mismas sometida a ensayo	Número interno	Tasa de recuperación de células tratadas (placa con SA)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa con SA)	Tasa de recuperación de células tratadas (placa sin tratar)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa sin tratar)	Observaciones
Compuesto de colesterol (5'- XXYFZ-3')	29.891180	73,2 %	16,3 %	56,7 %	68,7 %	Tinción fuerte
Compuesto de Ácido borónico (individual)	15.260267	16,3 %	13,0 %	32,5 %	41,3 %	
Compuesto de colesterol (5'- XXYFZ-3')	29.891180	71,7 %	24,4 %			
Compuesto de diestearoílo (Avanti)		53,8 %				
Compuesto de Col + Compuesto de diestearoílo	29.891180	74,7 %				
Compuesto de colesterol (5'- XXYFZ-3')	29.891180	83,2 %	30,6 %			
compuesto de diestearoílo (Avanti)		66,7 %				
Compuesto de Col + Compuesto de diestearoílo	29.891180	80,2 %				
Compuesto de colesterol 200 µl de Zellsus.	29.891180	67,6 % / 71,9 %				
Compuesto de colesterol 400 µl Zellsus.	29.891180	78,4 % / 84,1 %				
Compuesto de colesterol 800 µl Zellsus.	29.891180	81,1 % / 86,4 %				
Compuesto de colesterol (5'- XXYFZ-3')	29.891180	80,9	30,8 %			
Compuesto de diestearoílo (Avanti)		50,6 %				
Compuesto de colesterol + Compuesto de diestearoílo	29.891180	77,8 %				
Compuesto de ácido mirístico (5'-XXYFZ-3')C1	29.891194	20,7 %	21,6 %			Tinción débil
Compuesto de ácido mirístico (5'-XXYFZ-3')C2	29.891194	22,1 %				
Compuesto de ácido mirístico (5'-XXYFZ-3')C1	29.891194	33,1 %	19,5 %			Tinción más fuerte

ES 2 708 360 T3

Molécula/ combinación de las mismas sometida a ensayo	Número interno	Tasa de recuperación de células tratadas (placa con SA)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa con SA)	Tasa de recuperación de células tratadas (placa sin tratar)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa sin tratar)	Observaciones
Compuesto de ácido mirístico (C14-Lys-PEG)	15.260268	47,7 %	19,5 %			
Compuesto de colesterol (5'- XXYFZ-3')	29.891194	63,4 %	10,7 %			
Compuesto de ácido mirístico (C14-Lys-PEG) 1	15.260268	53,9 %				
Compuesto de colesterol + Compuesto de Mir	29.891194/15.260268	43,6 %				
Compuesto de colesterol + Compuesto de Mir	29.891194/15.260268	43,6 %				
Compuesto de colesterol 2,16 µg/2x10e6 leucocitos	29.891180	78,6 %				
Compuesto de colesterol 21,6 µg/2x10e6 leucocitos	29.891180	68,6 %				
Compuesto de colesterol 216 µg/2x10e6 leucocitos	29.891180	50,1 %				
Compuesto de Mir 2,16 µg/2x10e6 leucocitos	15.260268	39,6 %				Concentracio- nes mayores se
Compuesto de Mir 21,6 µg/2x10e6 leucocitos	15.260268	46,7 %				someterán a ensayo nuevamente
Compuesto de Mir 216 µg/2x10e6 leucocitos	15.260268	51,8 %				
Compuesto de colesterol (5'- XXYFZ-3')	29.891194	89,6 %				
Compuesto de diestearoílo (Avanti)		82,6 %				
Compuesto de ácido mirístico (C14-Lys-PEG)	15.260268	85,7 %				
Compuesto de colesterol + Compuesto de diestearoílo	29.891194	84,3 %				

ES 2 708 360 T3

Molécula/ combinación de las mismas sometida a ensayo	Número interno	Tasa de recuperación de células tratadas (placa con SA)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa con SA)	Tasa de recuperación de células tratadas (placa sin tratar)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa sin tratar)	Observaciones
Compuesto de colesterol + Compuesto de Mir	29.891194/15.260268	91,3 %				
Col + Diestearoílo + Mir	29.891194/15.260268	87,0 %				
Compuesto de colesterol (5'- XXYFZ-3')	29.891194	74,0 %				
Compuesto de diestearoílo (Avanti)		53,5 %				
Compuesto de ácido mirístico (C14-Lys-PEG)	15.260268	45,6 %				
Compuesto de colesterol + Compuesto de diestearoílo	29.891194	71,7 %				
Compuesto de colesterol + Compuesto de Mir	29.891194/15.260268	68,4 %				
Col + Diestearoílo + Mir	29.891194/15.260268	64,9 %				
Compuesto de colesterol 10 min 4 °C	29.891194	81,6 %				
Compuesto de colesterol 60 min 4 °C	29.891194	81,7 %				
Compuesto de colesterol 10 min TA	29.891194	88,3 %				
Compuesto de colesterol 60 min TA	29.891194	85,5 %				
Compuesto de colesterol 10e4 MDA en leucocitos	29.891194	99,0 %				
Compuesto de colesterol 5x 10e5 leucocitos	29.891194	70,0 %				
Compuesto de colesterol 20e3 MDA en leucocitos	29.891194	102,0 %				
Compuesto de colesterol 5x 10e5 leucocitos	29.891194	70,8 %				

Molécula/ combinación de las mismas sometida a ensayo	Número interno	Tasa de recuperación de células tratadas (placa con SA)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa con SA)	Tasa de recuperación de células tratadas (placa sin tratar)	Tasa de recuperación de células sin tratar (placa sin tratar)	Observaciones
Compuesto de colesterol 40e3 MDA en leucocitos	29.891194	102,0 %				
Compuesto de colesterol 10e6 leucocitos	29.891194	69,4 %				
Mir-Mir-C18- Fluos	29.891213	67,4 %				Tinción fuerte
Mir-Mir-PEG- Fluos	29.891194	24,4 %				Tinción débil
Mir-Mir-7xC18- Fluos	29.891214	78,9 %				Tinción fuerte
Mir-C9-Mir-PEG- Fluos	29.891197	no hay suficiente material				Tinción débil

C) Comparación de los resultados obtenido tras el pretratamiento de los pocillos de la placa o de las células con moléculas de la invención

- 5 Los experimentos se realizaron para diferentes tiempos de incubación, como se muestra a continuación:

30 min	diana: 300.000 leucocitos					
Pocillo			PM	Desviación típica	Media %	Desviación típica %
a1	Pocillo tratado	61470	64909	8131,2	21,64	2,71
a2	Pocillo tratado	67259				
a3	Pocillo tratado	74951				
a4	Pocillo tratado	55956				
b1	Sin tratar	55575	29059,75	19683,1	9,69	6,56
b2	Sin tratar	32017				
b3	Sin tratar	17166				
b4	Sin tratar	11481				
c1	Leucocitos tratados	213072	231829,75	13176,7	77,28	4,39
c2	Leucocitos tratados	237475				
c3	Leucocitos tratados	243445				
c4	Leucocitos tratados	233327				

90 min	diana: 300.000 leucocitos					
Pocillo			PM	Desviación típica	Media %	Media %
a1	Pocillo tratado	124492	142865	13000,28	47,62	4,33
a2	Pocillo tratado	143548				
a3	Pocillo tratado	154212				
a4	Pocillo tratado	149208				
b1	Sin tratar	46601	27972	13732,98	9,32	4,58
b2	Sin tratar	29206				
b3	Sin tratar	21199				
b4	Sin tratar	14882				
c1	Leucocitos tratados	237185			83,12	2,72
c2	Leucocitos tratados	252944				
c3	Leucocitos tratados	254697				

ES 2 708 360 T3

90 min	diana: 300.000 leucocitos					
Pocillo			PM	Desviación típica	Media %	Media %
c4	Leucocitos tratados	252559	249346,25	8160,72		

120 min	diana: 300.000 leucocitos					
Pocillo			PM	Desviación típica	Media %	Media %
a1	Pocillo tratado	167671			57,02	6,37
a2	Pocillo tratado	177678				
a3	Pocillo tratado	192194				
a4	Pocillo tratado	146708	171062,75	19104,5		
b1	Sin tratar	46402			9,74	4,88
b2	Sin tratar	35669				
b3	Sin tratar	20989				
b4	Sin tratar	13798	29214,5	14633,3		
c1	Leucocitos tratados	256949			86,23	2,43
c2	Leucocitos tratados	268552				
c3	Leucocitos tratados	258291				
c4	Leucocitos tratados	250979	258692,75	7300,7		

Los resultados de la inmovilización se resumen como sigue:

	30 min		90 min		120 min	
	Tasa de recuperación de leucocitos [%]	Desviación típica	Tasa de recuperación de leucocitos [%]	Desviación típica	Tasa de recuperación de leucocitos [%]	Desviación típica
Molécula de la invención unida a la superficie	21,64	2,71	47,6	4,33	57,02	6,37
Molécula de la invención + células	77,28	4,39	83,1	2,72	86,23	2,43
Sin tratar	9,69	6,56	9,3	4,58	9,74	4,88

5

	30 min	90 min	120 min
Molécula de la invención unida a la superficie	21,64	47,6	57,02
Molécula de la invención + células	77,28	83,1	86,23
Sin tratar	9,69	9,3	9,74

D) Determinación de la tasa de recuperación para el compuesto de ejemplo Biotina-PEG-lys-(C14)2:

La siguiente tasa de recuperación se determinó para el compuesto Biotina-PEG-lys-(C14)2:

10

$$M = 2708,90 \text{ g/mol}$$

$$5,4 \text{ mg/10 ml de EtOH}$$

15

$$c = n/V = m/M \cdot V$$

$$c = 5,4 \text{ g}/(2708,9 \text{ g/mol} \cdot 10 \text{ l}) = 1,99 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$1,99 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} = 7,96 \text{ nmol/4 } \mu\text{l}$$

20

$$4 \text{ } \mu\text{l} = 4,5 \cdot 10^6 \text{ células}$$

$$\rightarrow 1,77 \text{ nmol/10e6 células}$$

25

Tasa de recuperación en este experimento: 85,72 %

Ejemplo 4: Comparación de compuestos de la invención que contienen uno frente a dos restos hidrófobos

Objetivo de este experimento: ensayo de inmovilización de leucocitos sobre una superficie recubierta con estreptavidina usando diferentes moléculas de la invención. En particular, se sometió a ensayo el rendimiento de una única molécula de colesterol y diferentes moléculas enlazadoras dobles (es decir, que contienen dos restos hidrófobos). En detalle, se sometió a ensayo la inmovilización de glóbulos blancos (leucocitos) sobre una superficie recubierta con estreptavidina usando diferentes moléculas enlazadoras sobre una placa de 12 pocillos: 300 000 leucocitos/pocillo. Esto se siguió mediante la medición de la tasa de recuperación de células después de la inmovilización y el lavado de las células usando el instrumento Cellavista (10x Operador de Núcleos s9s5).

Molécula sometida a ensayo	Características	N.º interno	Estructura
5'-(Colesterol-TEG)1-Doblador-dT-Biotina-3'	Mono-enlazador	29.891272	Y = Colesterol-TEG X = Doblador Z = dTBiotina
5'-(Colesterol-TEG)2-Espaciador C12-dTBiotina_TEG-3' INVERSA	Enlazador doble	29.891253	3'-YY X T Z-5' Y = Colesterol-TEG X = Espaciador C12 Z = Biotina-TEG
5'-(Colesterol-TEG)2-Espaciador C18-Fluos-Biotina_TEG-3' INVERSA	Enlazador doble	29.891254	3'-YY X W Z-5' Y = Colesterol-TEG X = Espaciador C18 W = fluoresceína Z = biotina-TEG

Los resultados son los siguientes:

Muestra 1				
N.º de referencia interna del compuesto		Desviación típica de la media	Tasa de recuperación	Desviación típica
A1 29.891253	105061	17632,25	41,44 %	5,88 %
B1 29.891253	128195			
C1 29.891253	139678			
A2 29.891254	157660	16339,42	57,63 %	5,45 %
B2 29.891254	190148			
C2 29.891254	170850			
A3 29.891272	147132	19366,19	56,49 %	6,46 %
B3 29.891272	179643			
C3 29.891272	181620			

Concentración del compuesto: 1 nmol/10e6 leucocitos

N.º de referencia interna del compuesto		Desviación típica de la media	Tasa de recuperación	Desviación típica
A1 29.891253	218861	6689,53	72,13 %	2,23 %
B1 29.891253	221471			
C1 29.891253	208802			
A2 29.891254	244649	13351,64	82,19 %	4,45 %
B2 29.891254	234262			
C2 29.891254	260760			
A3 29.891272	199973	14735,92	72,13 %	4,91 %
B3 29.891272	220701			
C3 29.891272	228481			

Muestra2A) Concentración del compuesto: 100 pmol/10e6 leucocitos

	N.º de referencia interna del compuesto		Media	Desviación típica de la media	Tasa de recuperación	Desviación típica
A1	29.891253	178919			62,59 %	3,04 %
B1	29.891253	197130				
C1	29.891253	187224	187757,67	9117,22		
A2	29.891254	185100			65,69 %	3,58 %
B2	29.891254	200184				
C2	29.891254	205917	197067,00	10752,84		
A3	29.891272	161504			62,11 %	7,22 %
B3	29.891272	201424				
C3	29.891272	196021	186316,33	21657,26		

5

B) Concentración del compuesto: 1 nmol/10e6

Leucocitos						
	N.º de referencia interna del compuesto		Media	Desviación típica de la media	Tasa de recuperación	Desviación típica
A1	29.891253	239105			79,02 %	1,65 %
B1	29.891253	240632				
C1	29.891253	231420	237052,33	4937,14		
A2	29.891254	244396			81,79 %	0,59 %
B2	29.891254	244304				
C2	29.891254	247428	245376,00	1777,68		
A3	29.891272	241232			82,47 %	2,31 %
B3	29.891272	254894				
C3	29.891272	246129	247418,33	6921,66		

Conclusión: La molécula mono-enlazadora de colesterol (es decir, un compuesto que contiene un solo resto de colesterol hidrófobo) muestra características similares de inmovilización de células en comparación con las moléculas enlazadoras dobles (es decir, compuestos que contienen dos restos hidrófobos).

10

Ejemplo 5: Estabilización de células usando compuestos de la invención

Se determinó el efecto de los compuestos de la invención sobre células estabilizadoras y sobre la inmovilización.

15 A) Tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación y la inmovilización de células usando diferentes moléculas

Como se muestra en la Figura 14, las sondas moleculares HH1749*, HH1750* y HH1755* (*Biotina-PEG-Lisina-(C18)2) muestran diferentes rendimientos con respecto a la tasa de recuperación después de la centrifugación: cuanto mayor es la concentración de la molécula, mayor es la tasa de recuperación de células después de la centrifugación. Características de la centrifugación: 10 min, 300 x g. Como puede observarse en la Figura 15, las sondas moleculares HH1749*, HH1750* y HH1755* muestran un rendimiento diferente con respecto a la tasa de inmovilización de células a diferentes concentraciones. Cuanto mayor es la concentración del enlazador, mayor es la tasa de inmovilización de células.

25

25 B) Tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación usando diferentes enlazadores - diferentes puntos temporales

Como puede observarse en la Figura 16, las moléculas A y B (A: Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG; B: Biotina-PEG-Lisina-(C18)2) muestran un rendimiento diferente con respecto a la tasa de recuperación después de la centrifugación. Cuanto mayor es la concentración de la molécula, mayor es la tasa de recuperación de células después de la centrifugación. La molécula B permite la inmovilización de células en 3,5 horas. Características de la centrifugación: 10 min, 300 x g. A: Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG. B: Biotina-PEG-Lisina-(C18)2

35

35 C) Tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación - diferentes experimentadores

Como puede observarse a partir de la Figura 17, cuanto mayor es la concentración de la molécula, mayor es la tasa de recuperación de células después de la centrifugación. Además, la estabilización de células es independiente del

experimentador. Características de la centrifugación: 10 min, 300 x g. Molécula: Colesteril-TEG-Colesteril-TEG-(EspaciadorC18)7-Fluos-Biotina-TEG.

D) Tasa de recuperación de leucocitos después de la centrifugación - diferentes puntos temporales y ajustes de centrifugación

Los resultados del primer experimento se muestran en la Figura 18. Se sometieron a ensayo las siguientes moléculas:

- 1234: 5'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-dT-Biotina-TEG-3'
- 1248: 3'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA 1254: 3'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA
- 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA
- Todas las moléculas permiten la inmovilización de las células en 2 horas.
- Los leucocitos en PBS se dañan durante la centrifugación a 300 x g durante 20 min.
- La molécula 1234 muestra el mejor rendimiento seguida del compuesto 1255 y 1254

Características de la centrifugación: 20 min, 300 x g.

Los resultados del segundo experimento en este contexto se muestran en la Figura 19. Se sometieron a ensayo las siguientes moléculas:

1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA 1234: 5'-(Colesteril TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotina-TEG-3'

1248: 3'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA

1254: 3'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA

Los resultados son como se indican a continuación:

- Todas las moléculas permiten la inmovilización de las células en 2 horas
- Los leucocitos en PBS se dañan durante la centrifugación a 500 x g durante 20 min
- La molécula 1234 muestra el mejor rendimiento seguida de las moléculas 1255 y 1254

Características de la centrifugación: 20 min, 500 x g. Los resultados del tercer experimento en este contexto se muestran en la Figura 20. Se sometieron a ensayo las siguientes moléculas:

- 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA
- 1234: 5'-(Colesteril-TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotina-TEG-3'
- 1248: 3'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA
- 1254: 3'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA

Los resultados son como se indican a continuación:

- Todas las moléculas permiten la inmovilización de las células en 2 horas
- Los leucocitos en PBS se dañan durante la centrifugación a 1000 x g durante 20 min

Características de la centrifugación: 20 min, 500 x g.

E) Tasa de recuperación de Jurkat después de la centrifugación – diferentes puntos temporales

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 21. Se sometieron a ensayo las siguientes moléculas:

- 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA
- 1234: 5'-(Colesteril-TEG)2-Espaciador C18-dT-Biotina-TEG-3'
- 1248: 3'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA
- 1254: 3'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-Fluos-Biotina-TEG-5' INVERSA

Los resultados son como se indican a continuación:

- Las células de cultivo Jurkat son estables durante los procesos de centrifugación en PBS, así como usando diferentes moléculas en 5,5 h.

Características de la centrifugación: 20 min, 500 x g.

F) Los restos enlazadores trifuncionales no influyen en la viabilidad celular.

5 Los resultados de un primer experimento en este contexto se muestran en las Figuras 22A y B.

Se realizó un ensayo de viabilidad celular usando el kit de proliferación WST-1 (RAS), empleando diferentes moléculas de la invención que difieren en los restos enlazadores trifuncionales.

10 → Los diferentes enlazadores no influyen en la viabilidad celular durante el tiempo de incubación del enlazador de 4 horas, como puede observarse a partir de la Figura 22.

Los resultados de un segundo experimento en este contexto se muestran en las Figuras 23A y B. Se descubrió que las moléculas de la invención sometidas a ensayo (N.º 1244 y 1274) no influyen en la morfología celular durante el tiempo de incubación del enlazador de 4,5 horas.

15 G) Morfología celular sin incubación con la molécula de la invención - diferentes puntos temporales

El resultado de este experimento se muestra en la Figura 24. A continuación se descubrió:

- 20
- Sin la adición de la molécula de la invención, las células difunden durante un tiempo de incubación de 4,5 horas.
 - La morfología celular no se ve afectada en las células de la derecha durante el tiempo de incubación.

H) Tasa de recuperación de MDA-MB468 después de la centrifugación - diferentes puntos temporales

25 El resultado de este experimento se muestra en la Figura 25. Se sometieron a ensayo los siguientes compuestos de la invención:

- 30
- 1234: 5'-(Colesteril-TEG)2-EspaciadorC18-dT-Biotina-TEG-3'
 - 1255: 3'-(Ácido mirístico)2-PEG2000-dT-Biotina-TEG-5' INVERSA

Se descubrió lo siguiente:

- 35
- Las células de cultivo MDA-MB468 son estables durante los procesos de centrifugación en PBS, así como usando diferentes moléculas de la invención en 5 h.

Características de la centrifugación: 20 min, 500 x g.

Ejemplo 6: Comparación de la placa con SA (placa con estreptavidina) incubada con el compuesto de la invención frente a leucocitos (glóbulos blancos) incubados con el compuesto de la invención

40 Como material de partida se usaron 5'-(Colesteril-TEG)2-PEG2000-Fluos-Biotin_TEG-3' INVERSA (14530 pmol/μl) (N.º de referencia interno: 29.891250) y un MTP (Microcoat) tratado con estreptavidina, placa de 12 pocillos.

La lisis de eritrocitos se realizó de la siguiente manera:

45 -EDTA-sangre completa 59.423 6.400 leucocitos/μl (Ambulanz Roche)
 tampón de lisis: NH₄Cl 100 mM + Hepes 5 mM + KHCO₃ 0,5 mM + EDTA-K
 Se cargó aproximadamente 1 x 8 ml de sangre completa en un tubo Falcon de 50 ml con tampón de lisis, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, se centrifugó a 250 g durante 15 min, el sedimento se resuspendió pipeteando dentro y fuera en tampón de lisis; se rellenó hasta 50 ml con tampón de lisis, se centrifugó a 250 g durante 15 min, el sedimento se resuspendió con PBS, se rellenó hasta 50 ml con PBS, se centrifugó a 250 g durante 15 min, se rellenó hasta 50 ml con PBS
 Se midieron los leucocitos en Sysmex
 1:37.100 leucocitos/μl

55 El diseño del experimento en la placa se explica a continuación (véase la Figura 2):
 3 x MTP de 12 pocillos: Tratamiento de los leucocitos con compuestos de la invención:
 determinación 4 veces:

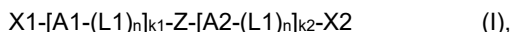
60 Fila A: Se introdujeron 200 μl de PBS, se añadió 1 nmol de compuesto al mismo respectivamente, se mezclaron, se incubaron aproximadamente 30 min, se lavaron 2 veces con PBS,
 se introdujeron 800 μl de PBS, se añadieron 300.000 leucocitos (sin tratar).
 Fila B: Se introdujeron 800 μl de PBS, se añadieron 300.000 leucocitos (sin tratar).
 Fila C: Se incubaron 10x10⁶ leucocitos en 1 ml con 10 nmol de compuesto de la invención durante 10 min, se introdujeron 800 μl de PBS/pocillo, 300.000 leucocitos tratados respectivamente.

- La primera placa de MTP se lavó después de 30 min 2 veces con PBS, se superpuso con Höchst y se incubó durante 15 min. > Se midió Cellavista (Operador s9s5).
- La segunda placa se midió después de 90 min.
- La tercera placa se midió después de 150 min.

Los resultados calculados se muestran en la Figura 3. Un gráfico que representa estos resultados se muestra en la Figura 4. Las placas de los experimentos se muestran en la Figura 5.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende, preferentemente que consiste en, uno o más dominios hidrófobos y un dominio hidrófilo, en el que el uno o más dominios hidrófobos se unen covalentemente a dicho dominio hidrófilo, y en el que el uno o más dominios hidrófobos comprenden cada uno un lípido lineal, que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 18 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α -tocoferol, y en el que el dominio hidrófilo comprende un compuesto de Fórmula (I):



en la que

Z es un resto de polietilenglicol (PEG) lineal que contiene de 1 a 50, preferentemente 4-30 restos $-O-CH_2-CH_2-$, en el que el resto de polietilenglicol comprende opcionalmente 1 o más restos espaciadores SP que conectan dos restos $-O-CH_2-CH_2-$, y en el que el resto de PEG lineal comprende opcionalmente un resto enlazador L3 en uno o ambos extremos,

cada L1 es un resto enlazador seleccionado independientemente entre sí,

cada n es 0 o 1, seleccionado independientemente entre sí,

A1 y A2 son restos bifuncionales o trifuncionales seleccionados independientemente entre sí, a condición de que al menos uno de A1 o A2 sea trifuncional, el resto trifuncional se selecciona entre lisina, serina, serinol, $-O-CH_2-CH((CH_2)_4-NH_2)-CH_2-$, un glicerol y un resto 1,3-diaminoglicerol,

en la que el resto bifuncional se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo fosfato, grupo carbamato, grupo amida, un resto que comprende una nucleobase, incluso más preferentemente dT, y un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de C, y cuya cadena de alquilo contiene grupos funcionales en los átomos de C terminales, en particular independientemente seleccionados entre grupos amino, carbonilo, hidroxilo, tiol, ácido carbónico,

k1 y k2 se seleccionan independientemente entre sí, y k1 es 1, 2, 3, 4 o 5, y k2 es 1, 2, 3, 4, 5 o 6,

X1 y X2 se seleccionan independientemente entre hidrógeno o un grupo protector,

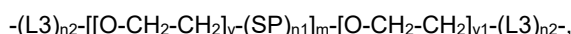
L3 se selecciona independientemente entre una cadena lineal de alquilo o alqueno con 1 a 10 átomos de C, que está opcionalmente (i) interrumpida por 1 a 3 átomos de N, O o S y/o (ii) sustituida con 1 a 4 grupos hidroxilo, carbonilo, amino o tiol,

los 1 o más restos espaciadores SP son independientes entre sí y se seleccionan entre el grupo que consiste en un fosfato y un resto bifuncional, y

en la que el uno o más dominios hidrófobos están unidos covalentemente a dicho dominio hidrófilo solo a través de los restos trifuncionales A1,

o una sal del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Z tiene la siguiente estructura:



en la que

SP es un resto espaciador,

cada resto espaciador SP se selecciona independientemente entre sí, y se selecciona entre el grupo que consiste en un fosfato y un resto bifuncional,

cada n1 es 0 o 1, seleccionado independientemente para cada uno de los restos m,

cada n2 es 0 o 1, seleccionado independientemente entre sí,

m es un número entero de 1 a 50, preferentemente de 4 a 30,

y es un número entero de 1 a 50, preferentemente de 4 a 30,

y1 es un número entero de 0 a 30, preferentemente de 0 a 10, más preferentemente de 0 a 4, a condición de que $y \cdot m + y1 \leq 100$,

L3 se selecciona independientemente entre una cadena lineal de alquilo o alqueno con 1 a 10 átomos de C, que está opcionalmente (i) interrumpida por 1 a 3 átomos de N, O o S, y/o (ii) sustituida con 1 a 4 grupos hidroxilo, carbonilo, amino o tiol,

preferentemente en la que

(a) n1 es idéntico para los m restos $-[O-CH_2-CH_2]_Y-(SP)_{n1}-$, y/o

(b) y1 es 0, y/o

(c) y es 4, 5 o 6, y n1 es 1, y/o

(d) n2 son los dos 0, o

(e) uno o los dos $n2 = 1$, y L3 es un grupo alquilo con 1 a 10 átomos de C que opcionalmente contiene un grupo amida, grupo carbonilo, carbamato y/o grupo NH.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que X1 o X2 se reemplaza por un dominio hidrófobo.

4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el lípido lineal se selecciona entre el grupo que consiste en ácido oleico, ácido mirístico, ácido esteárico y ácido behénico, preferentemente se selecciona entre ácido mirístico y ácido oleico.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:

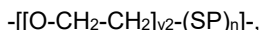
- (a) uno, dos, tres o cuatro, preferentemente uno o dos dominios hidrófobos se unen covalentemente al dominio hidrófilo, y/o
- (b) los dos o más dominios hidrófobos unidos covalentemente al dominio hidrófilo son diferentes o idénticos, preferentemente idénticos,

y/o

en los que los dominios hidrófobos

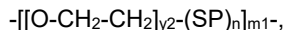
(a) consisten en un lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 22 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α -tocoferol, o

(b) comprenden el lípido lineal que es un ácido graso saturado que tiene de 12 a 22 átomos de C, el esteroide colesterol o la vitamina hidrófoba α -tocoferol unidos covalentemente a un resto trifuncional A1 a través de un resto enlazador L2, en el que L2 comprende, preferentemente consiste en, un grupo fosfato, un resto



en el que SP y n son como se han definido anteriormente, preferentemente $n = 0$, $y2$ es un número entero de 1 a 30, preferentemente de 3 a 10, y $m1$ es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 3, un resto de glicerol, un grupo carbamato, un grupo amida, un grupo alquilo lineal que tiene de 1 a 10 átomos de C, en particular 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 átomos, y cuya cadena de alquilo contiene grupos funcionales en los átomos de C terminales, en particular, seleccionados independientemente entre grupos amino, carbonilo, hidroxilo, tiol, ácido carbónico que están opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3, 4 o 5 restos R1, en los que R1 es independientemente un alquilo C1-C4, un hidroxialquilo C1-C4, aminoalquilo C1-C4, un cianoalquilo C1-C4, un hidroxilo, un tiol, un amino o un resto carbonilo, más preferentemente

L2 se selecciona entre el grupo que consiste en un fosfato, amida, carbamato, un grupo éster y un resto



en el que

SP y n son como se ha definido anteriormente, preferentemente $n = 0$, $y2$ es un número entero de 1 a 30, preferentemente de 3 a 10, y $m1$ es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 3,

más preferentemente en el que el lípido lineal, el esteroide o la vitamina hidrófoba se unen a un resto trifuncional A1 a través del resto enlazador tetraetilenglicol (TEG) o fosfato.

6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que $k1$ es 1, 2 o 3.

7. El compuesto de la reivindicación 6, en el que $k2$ es 1, 2 o 3.

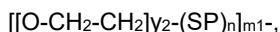
8. El compuesto de la reivindicación 7, en el que el compuesto comprende adicionalmente un resto marcador y/o un grupo de unión, preferentemente

en el que un resto marcador y/o un grupo de unión están unidos covalentemente a través del resto trifuncional A2, y/o en el que uno o más restos A2 son un grupo marcado o un grupo de unión, más preferentemente en el que un resto A2 es un resto que comprende una nucleobase, incluso más preferentemente en el que un resto A2 es dT, incluso más preferentemente en el que el resto marcador es un marcador fluorescente y/o en el que el grupo de unión es biotina.

9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que

(a) los enlazadores L1 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un grupo fosfato, amida, carbamato y éster, y/o

(b) los enlazadores L2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un fosfato, amida, carbamato, un grupo éster y un resto



en el que

SP y n son como se han definido anteriormente, preferentemente $n = 0$,

y2 es un número entero de 1 a 30, preferentemente de 3 a 10, y

m1 es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 3.

5

10. Una composición que comprende uno o más compuestos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, preferentemente

en la que la composición comprende al menos tres compuestos diferentes de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en la que

10

(i) los diferentes compuestos difieren al menos en sus dominios hidrófobos, y

(ii) los diferentes compuestos comprenden un resto marcador,

incluso más preferentemente en la que la composición comprende al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez compuestos diferentes.

15

11. Un método in vitro de marcado de una célula, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el compuesto comprende un resto marcador; y

20

(b) poner en contacto una célula con el compuesto en condiciones que permitan la interacción del compuesto con la membrana de la célula, inmovilizando de este modo el marcador en la célula; y

(c) opcionalmente detectar el marcador.

25

12. Un método in vitro de inmovilización de un grupo de unión sobre la superficie de una célula, comprendiendo el método

(a) proporcionar un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el compuesto comprende un grupo de unión; y

30

(b) poner en contacto una célula con el compuesto en condiciones que permitan la interacción del compuesto con la membrana de la célula, inmovilizando de este modo el grupo de unión.

13. Uso del compuesto de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el compuesto tiene un marcador, para el marcado in vitro de una célula.

35

14. Uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el compuesto tiene un grupo de unión, para la inmovilización in vitro de un grupo de unión sobre la superficie de la célula.

Figura 1

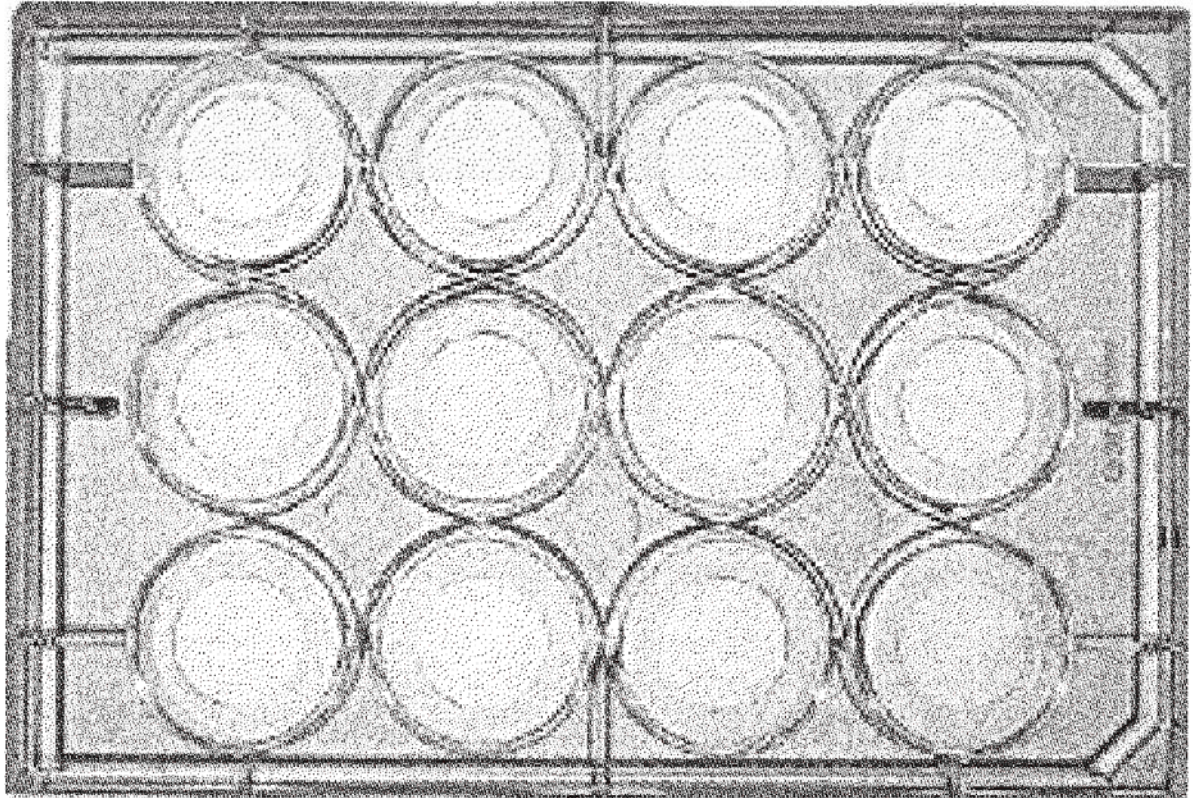


Figura 2

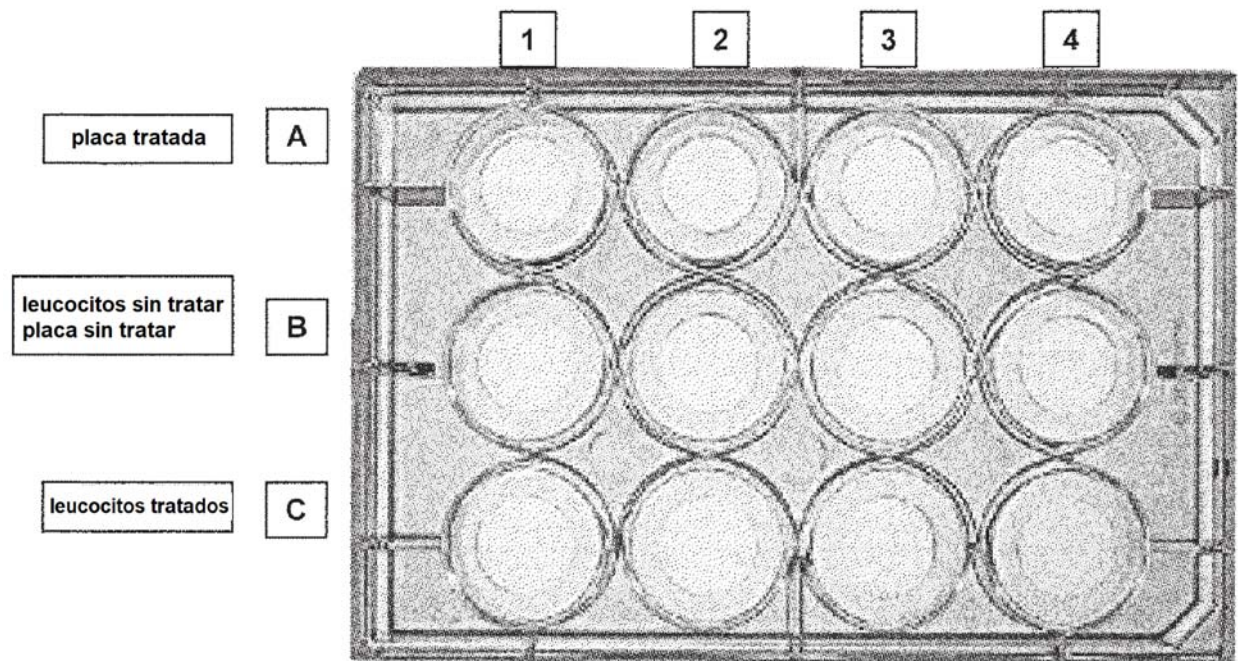


Figura 3

30min	diana: 300.000 leucocitos					
pocillo			PM	DT	Media %	DT %
a1	pocillo tratado	61470			21,64	2,71
a2	pocillo tratado	67259				
a3	pocillo tratado	74951				
a4	pocillo tratado	55956	64909	8131,2		
b1	sin tratar	55575			9,69	6,56
b2	sin tratar	32017				
b3	sin tratar	17166				
b4	sin tratar	11481	29059,75	19683,1		
c1	leucocitos tratados	213072			77,28	4,39
c2	leucocitos tratados	237475				
c3	leucocitos tratados	243445				
c4	leucocitos tratados	233327	231829,75	13176,7		
90min	diana: 300.000 leucocitos					
pocillo			PM	DT	Media %	Media %
a1	pocillo tratado	124492			47,62	4,33
a2	pocillo tratado	143548				
a3	pocillo tratado	154212				
a4	pocillo tratado	149208	142865	13000,28		
b1	sin tratar	46601			9,32	4,58
b2	sin tratar	29206				
b3	sin tratar	21199				
b4	sin tratar	14882	27972	13732,98		
c1	leucocitos tratados	237185			83,12	2,72
c2	leucocitos tratados	252944				
c3	leucocitos tratados	254697				
c4	leucocitos tratados	252559	249346,25	8160,72		
120min	diana: 300.000 leucocitos					
pocillo			PM	DT	Media %	Media %
a1	pocillo tratado	167671			57,02	6,37
a2	pocillo tratado	177678				
a3	pocillo tratado	192194				
a4	pocillo tratado	146708	171062,75	19104,5		
b1	sin tratar	46402			9,74	4,88
b2	sin tratar	35669				
b3	sin tratar	20989				
b4	sin tratar	13798	28214,5	14633,3		
c1	leucocitos tratados	256949			86,23	2,43
c2	leucocitos tratados	268552				
c3	leucocitos tratados	258291				
c4	leucocitos tratados	250979	258692,75	7300,9		

Figura 4

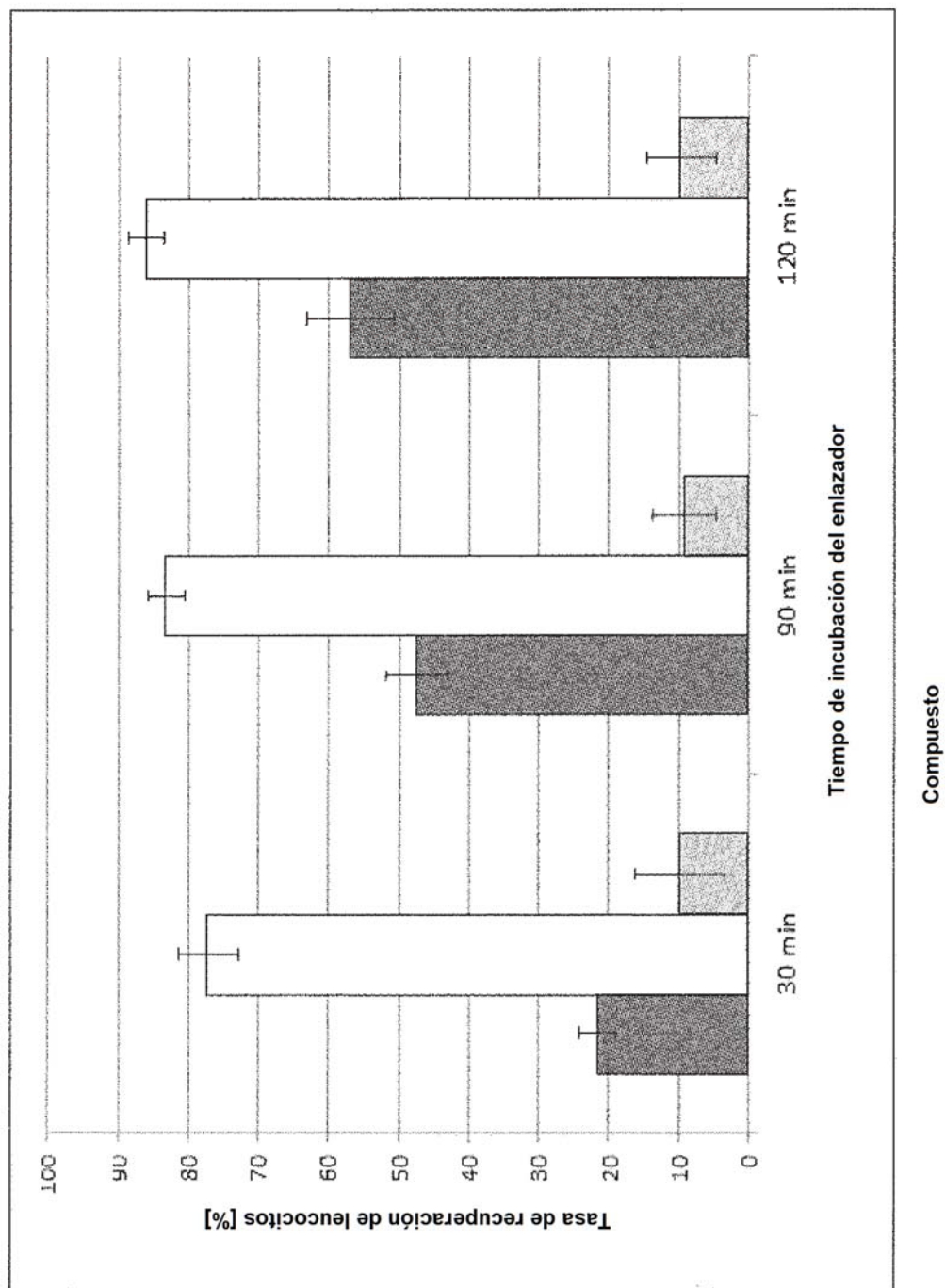


Figura 5

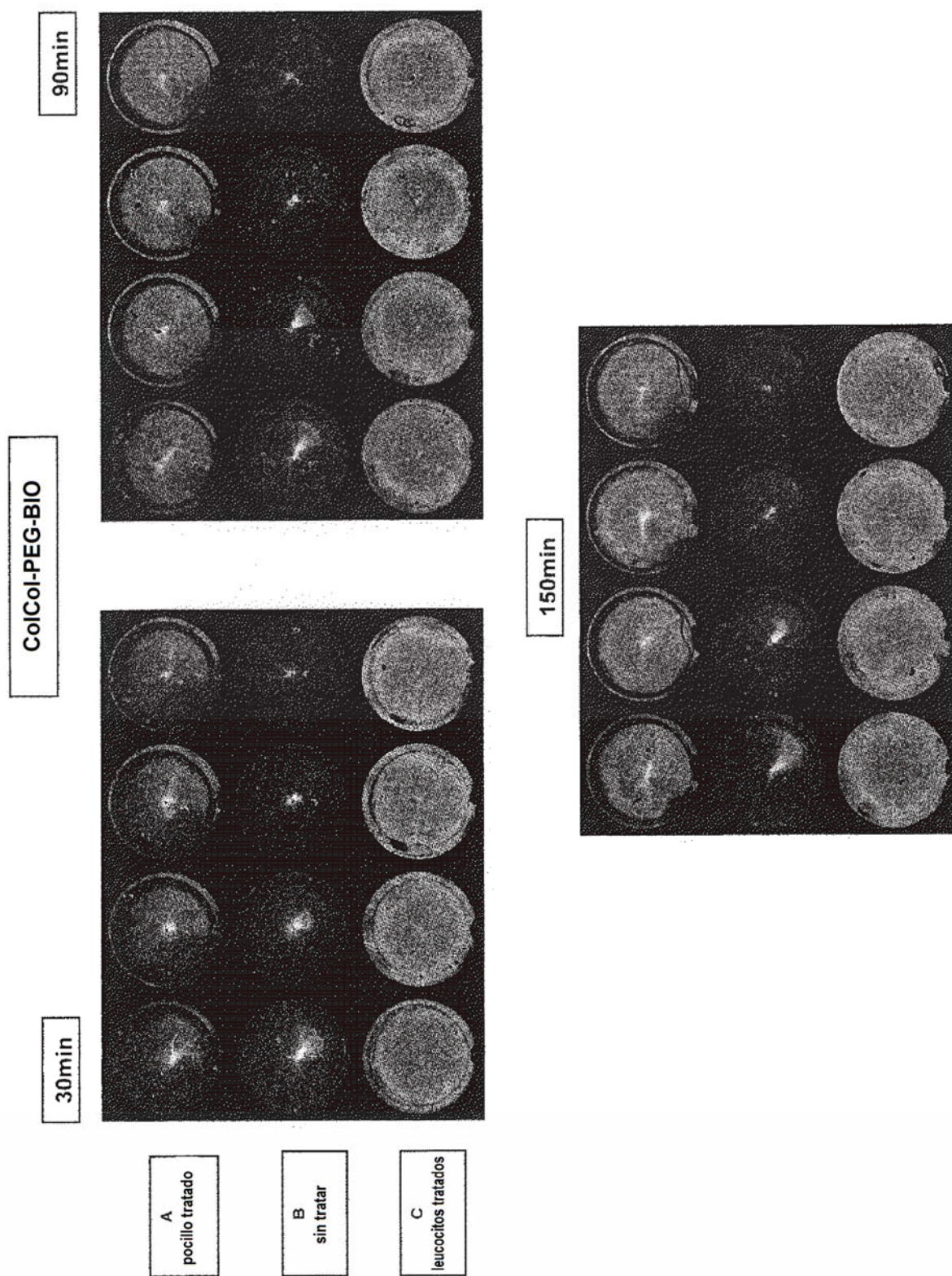


Figura 6

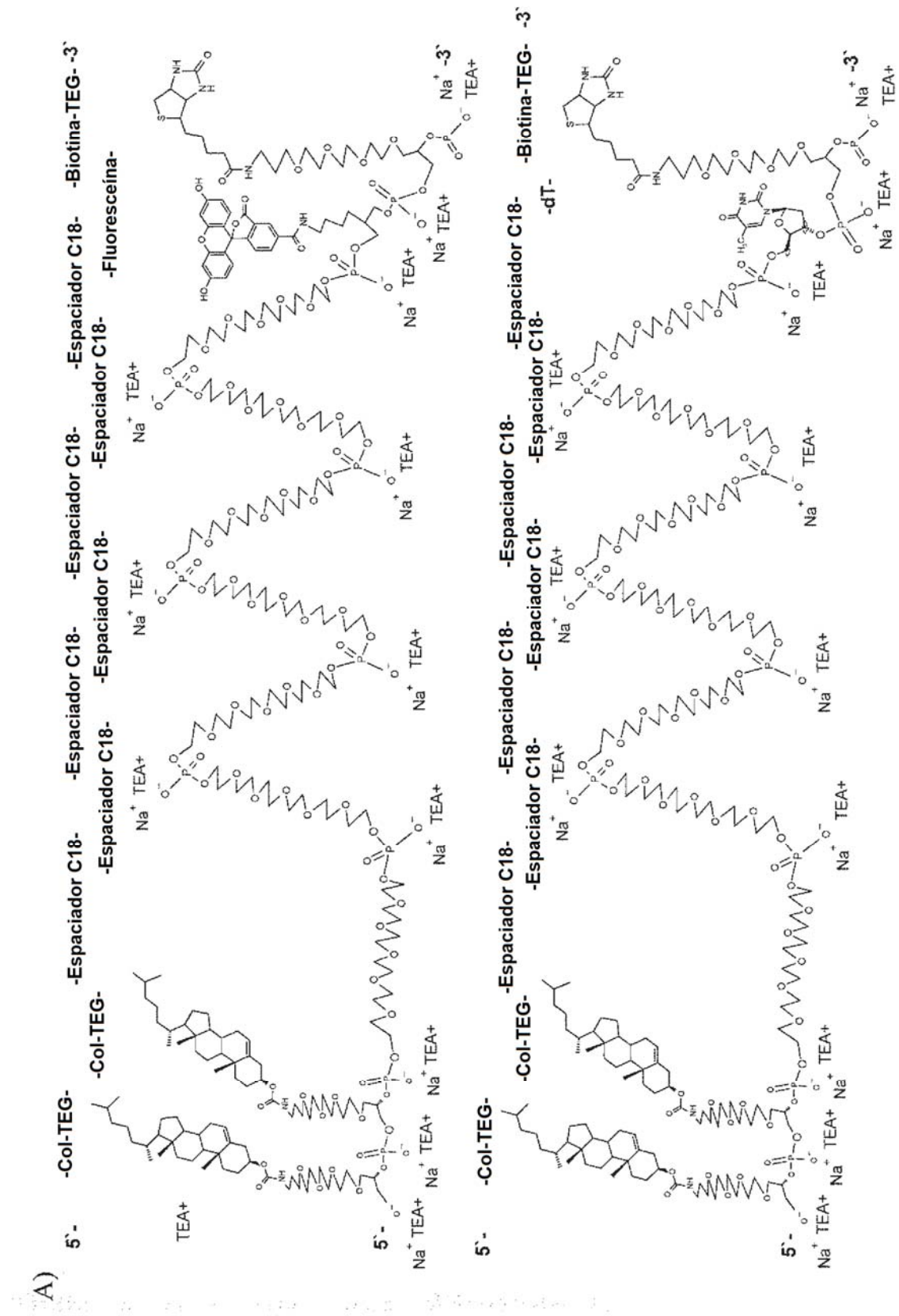
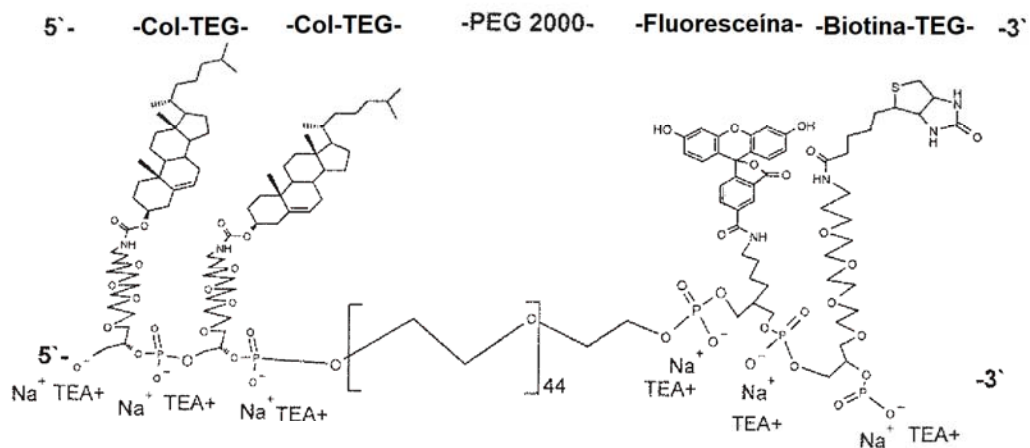


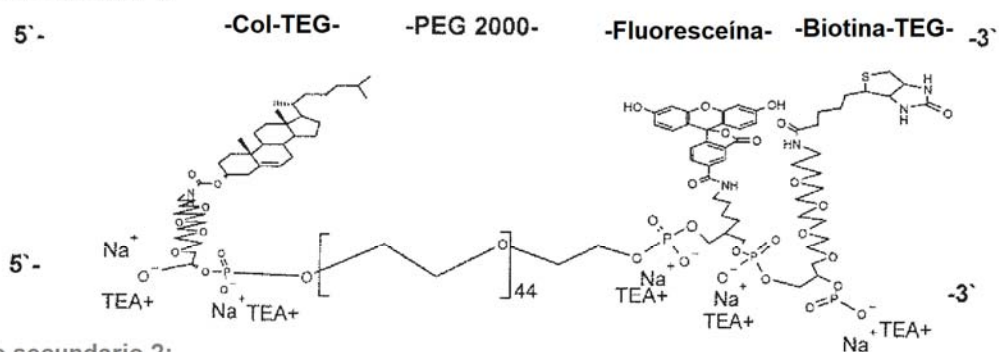
Figura 6 (continuación)

B)

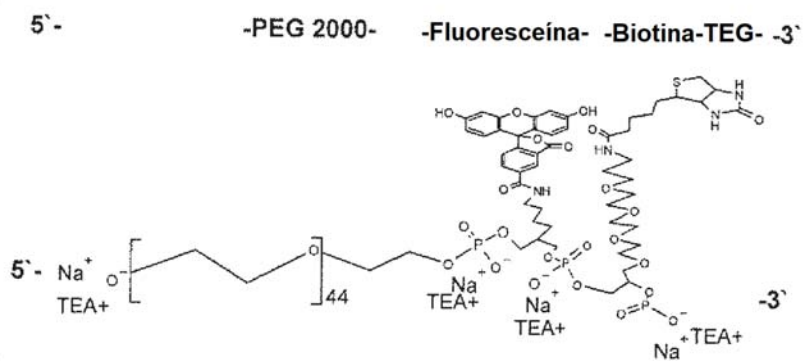
producto en bruto:



producto secundario 1:

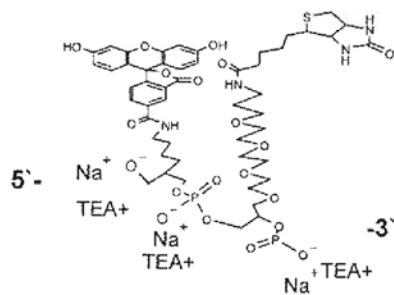


producto secundario 2:



producto secundario 3:

5'- -Fluoresceína- -Biotina-TEG- -3'



producto secundario 4:

5'- -Biotina-TEG- -3'

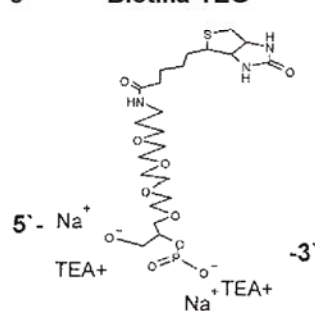
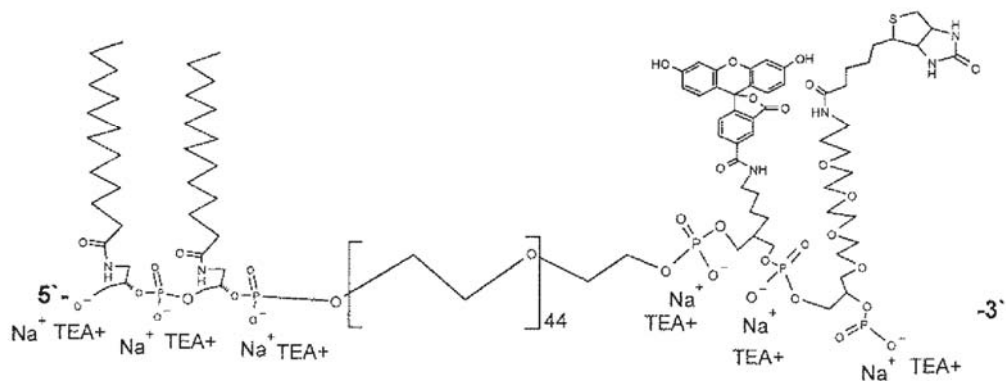


Figura 6 (continuación)

C)

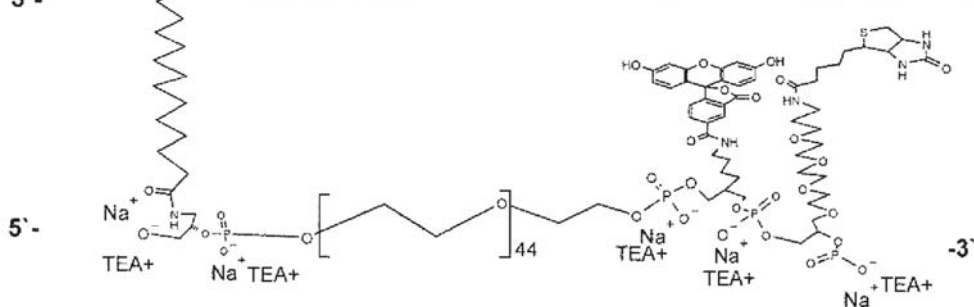
producto en bruto:

5'- -ácido mirístico- -ácido mirístico- -PEG 2000- -Fluoresceína- -Biotina-TEG- -3'



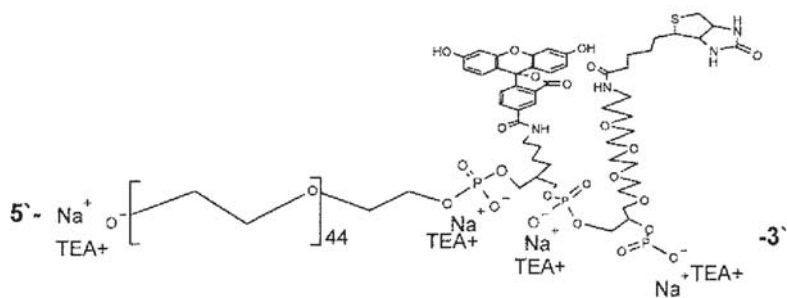
producto secundario 1:

5'- -ácido mirístico- -PEG 2000- -Fluoresceína- -Biotina-TEG- -3'



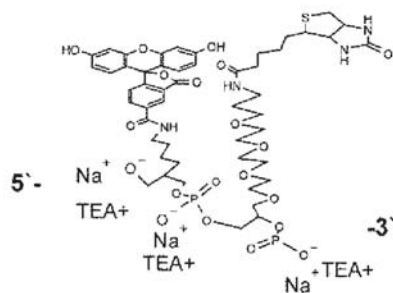
producto secundario 2:

5'- -PEG 2000- -Fluoresceína- -Biotina-TEG- -3'



producto secundario 3:

5'- -Fluoresceína- -Biotina-TEG- -3'



producto secundario 4:

5'- -Biotina-TEG- -3'

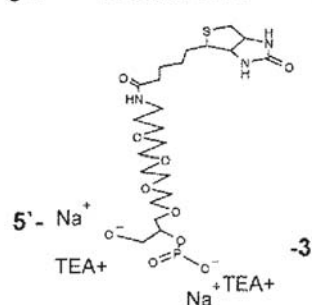


Figura 6 (continuación)

C)

Síntesis de Lys-(C18)2-eda

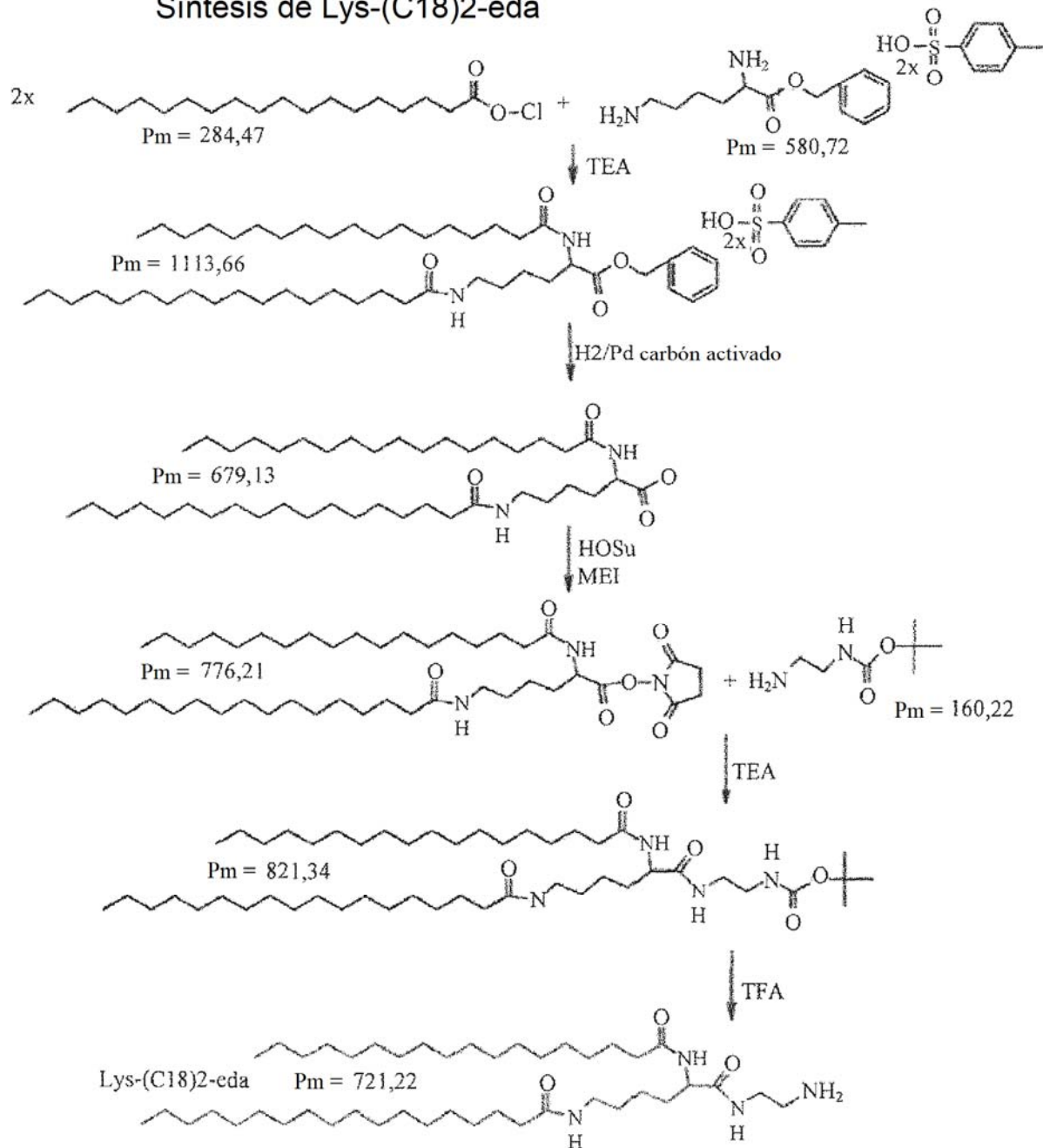


Figura 6 (continuación)

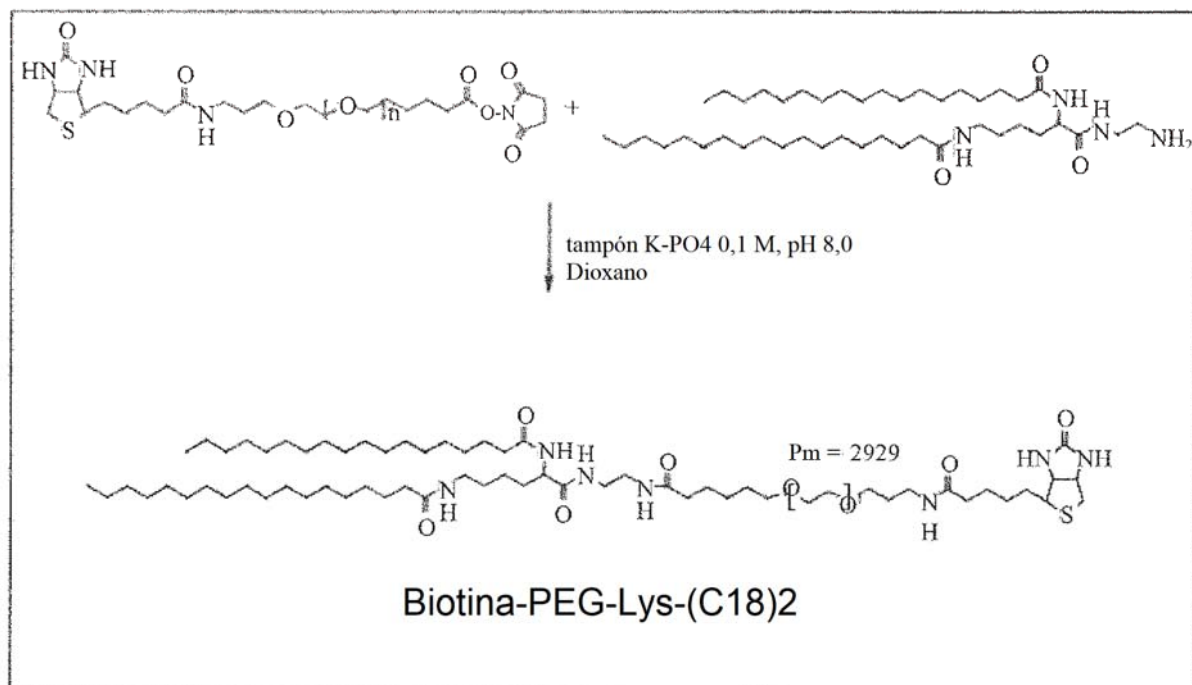
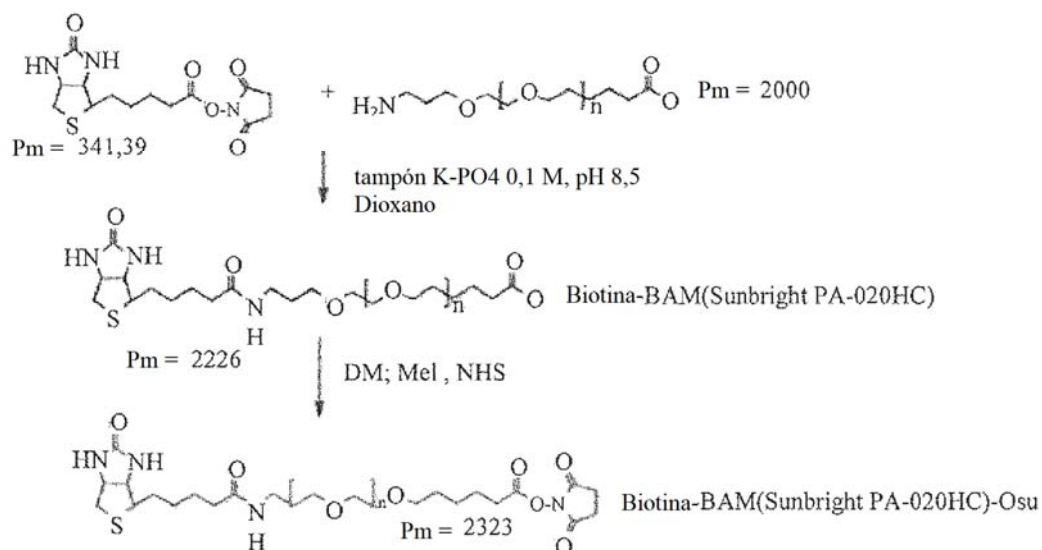
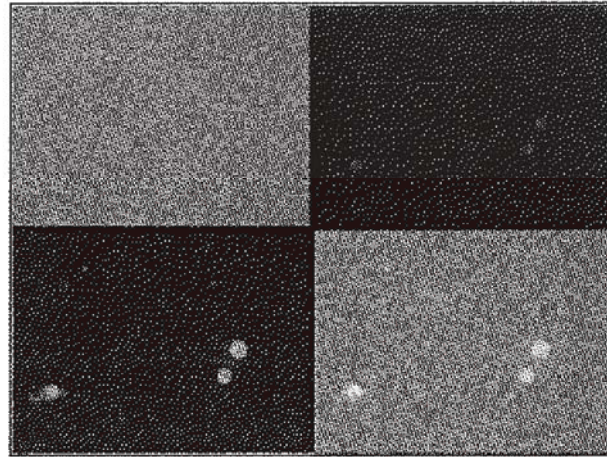
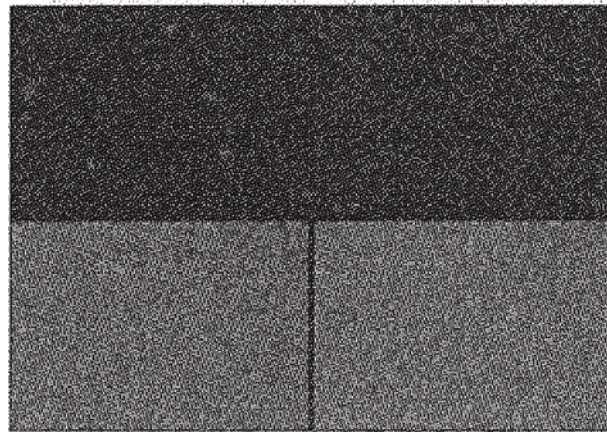


Figura 7

A)



B)



C)

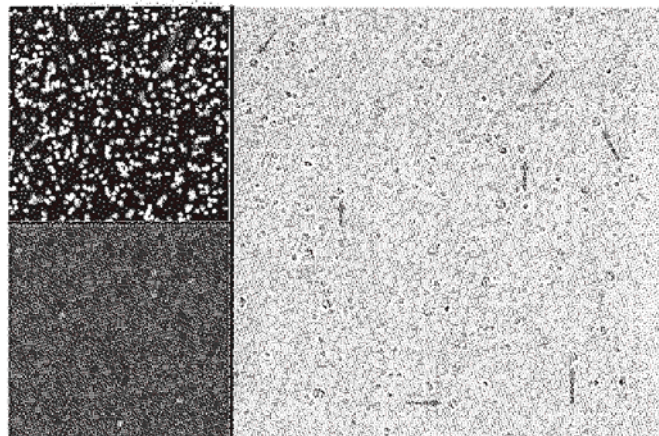
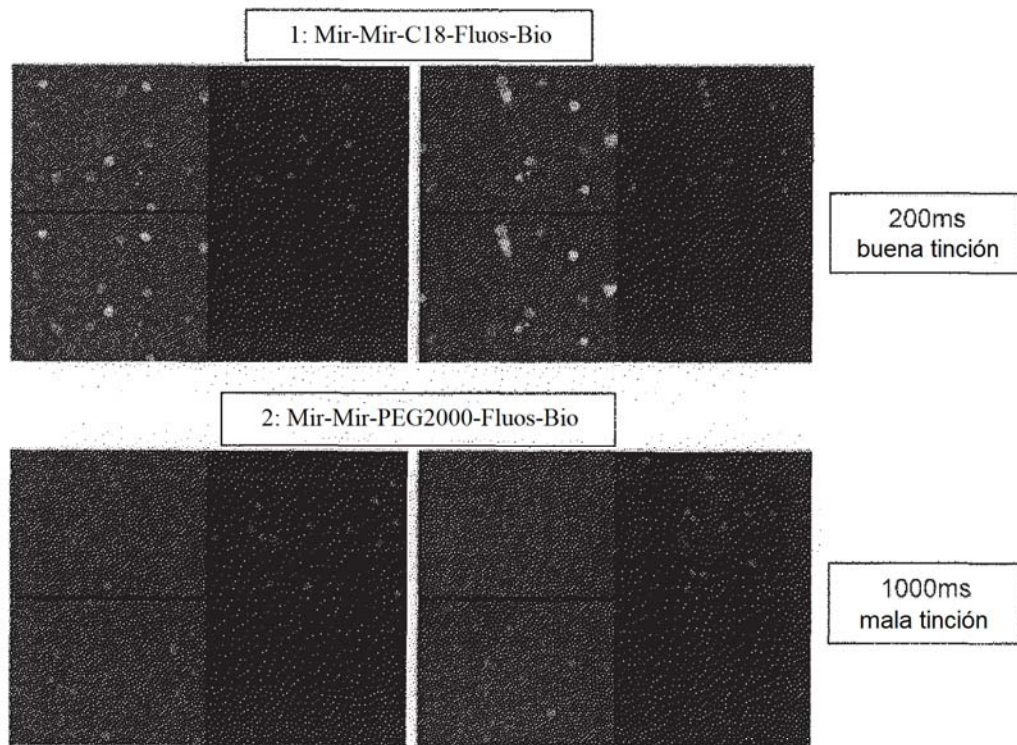


Figura 7 (continuación)

D)



E)

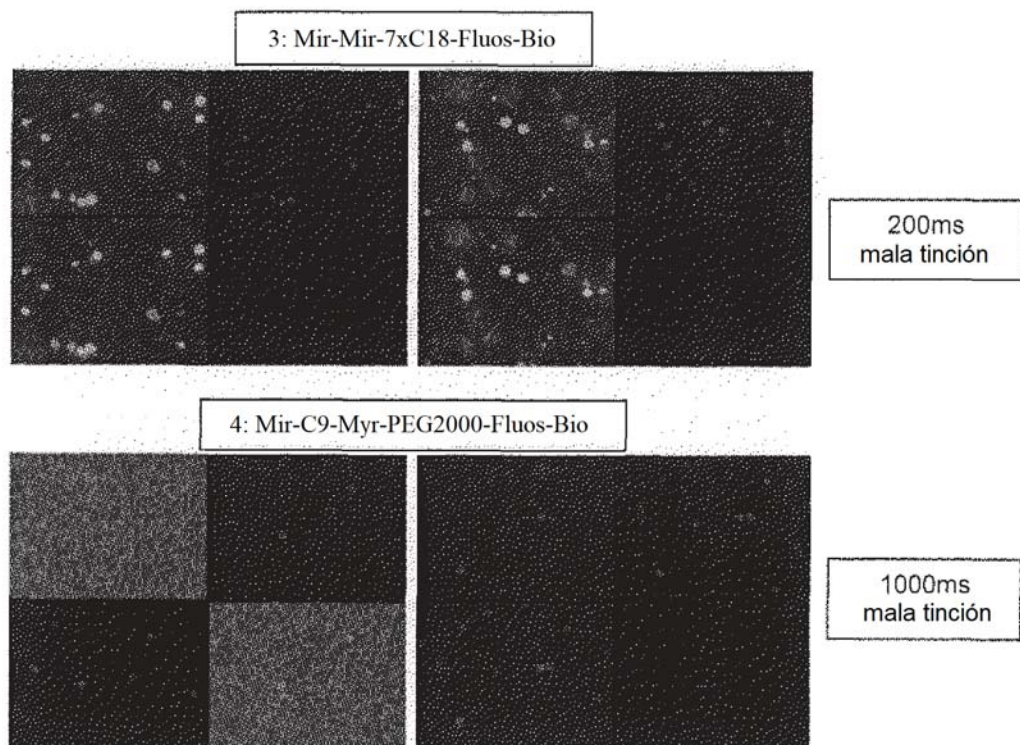


Figura 8

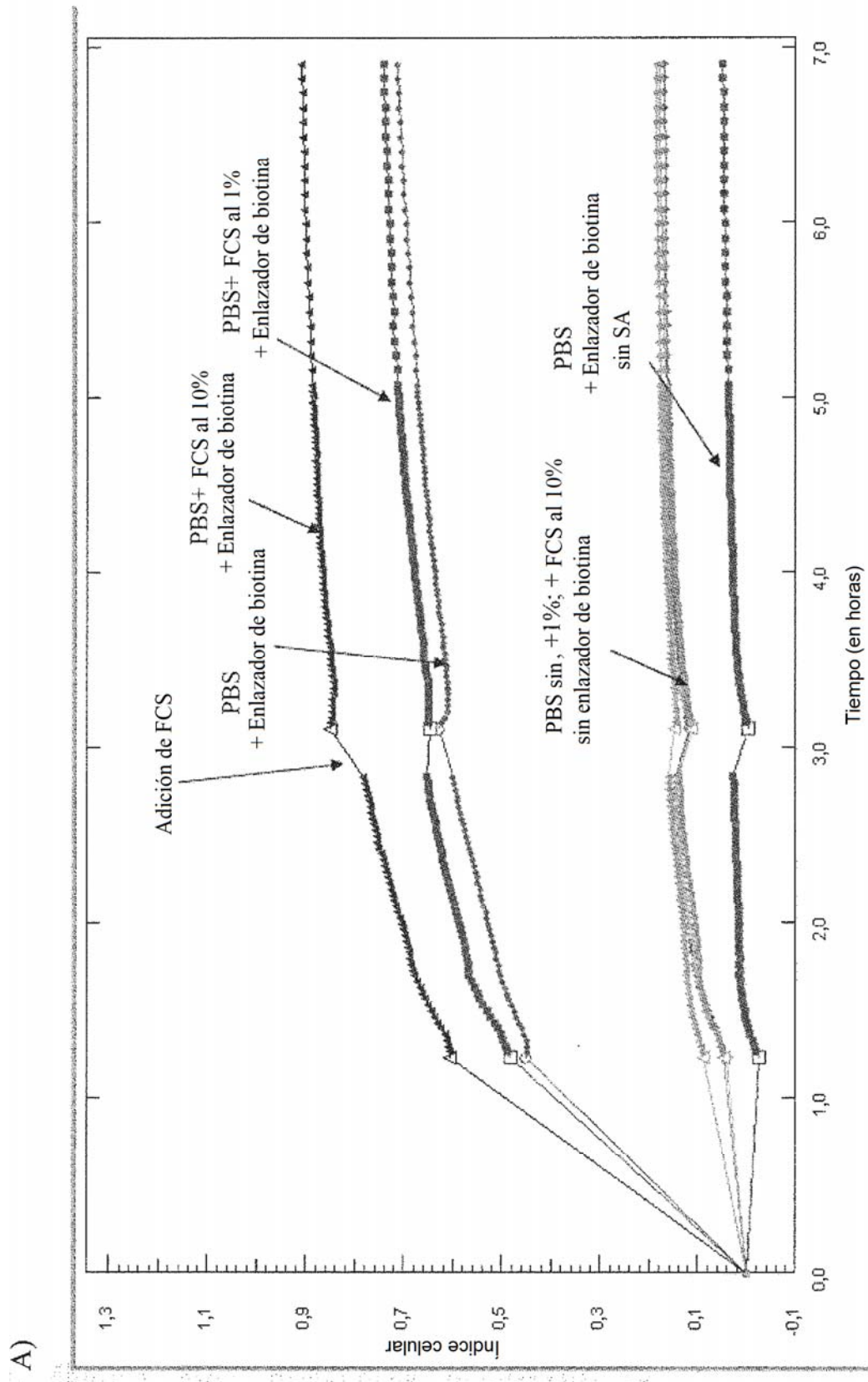


Figura 8 (continuación)

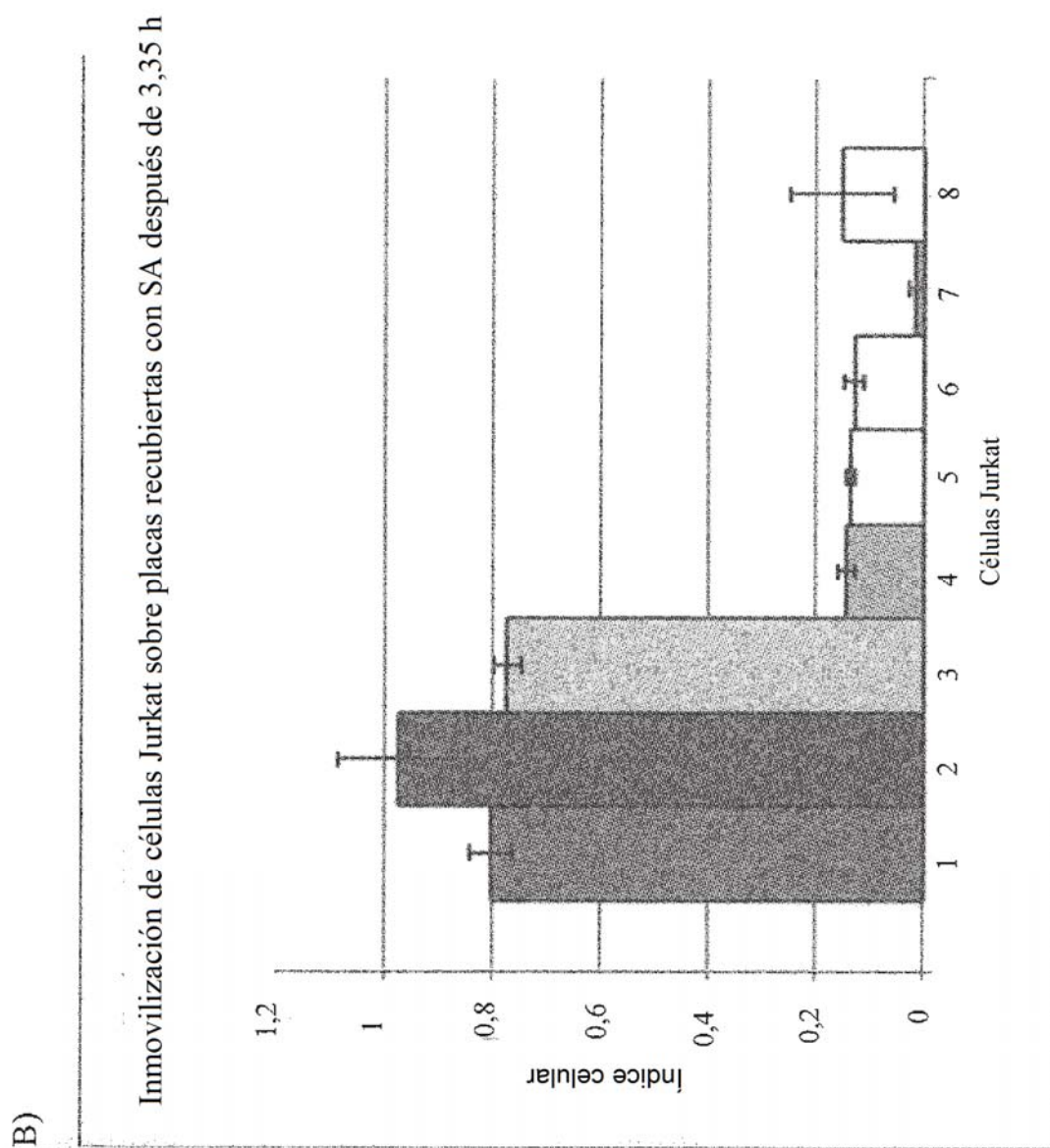


Figura 9

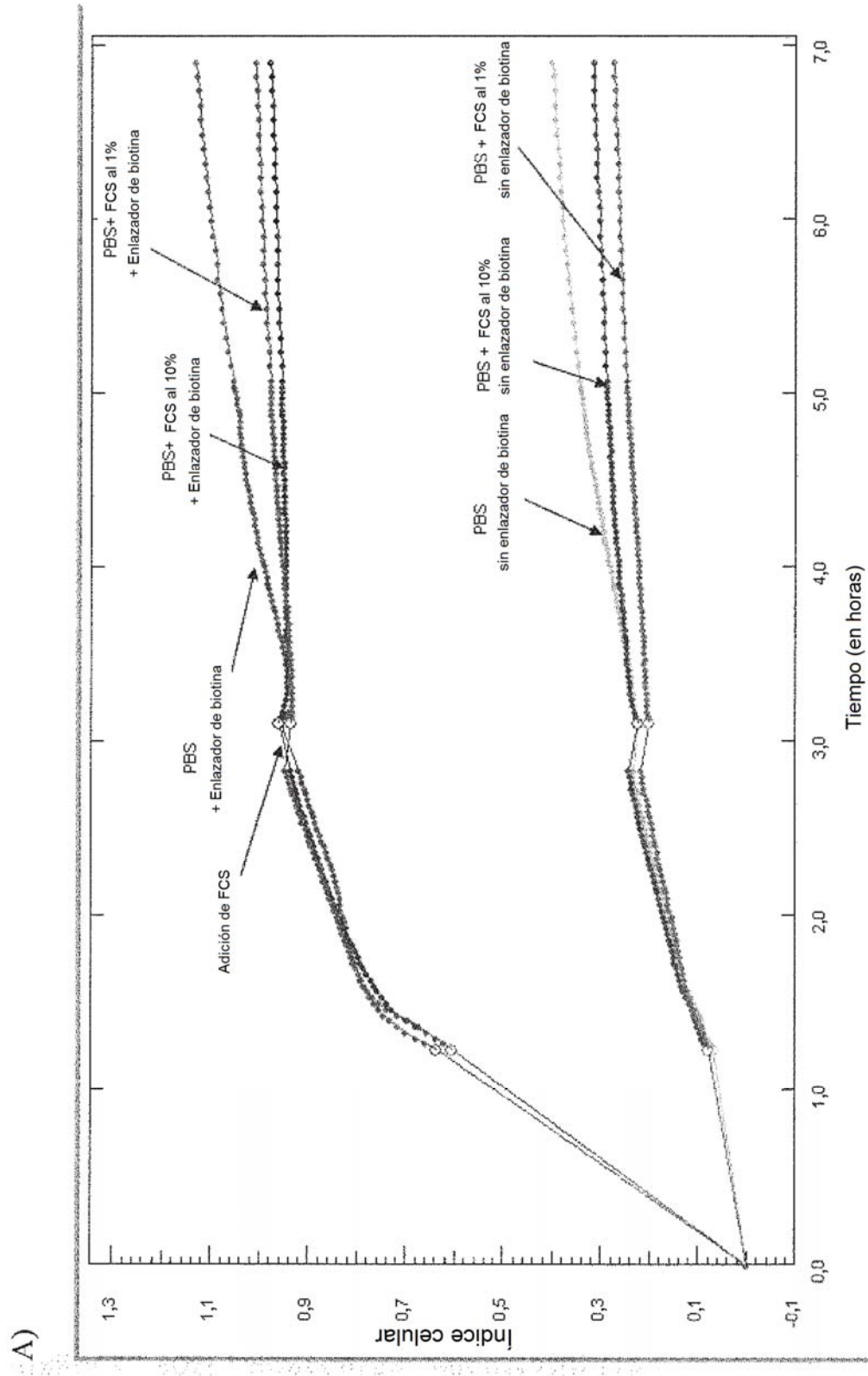


Figura 9 (continuación)

B)

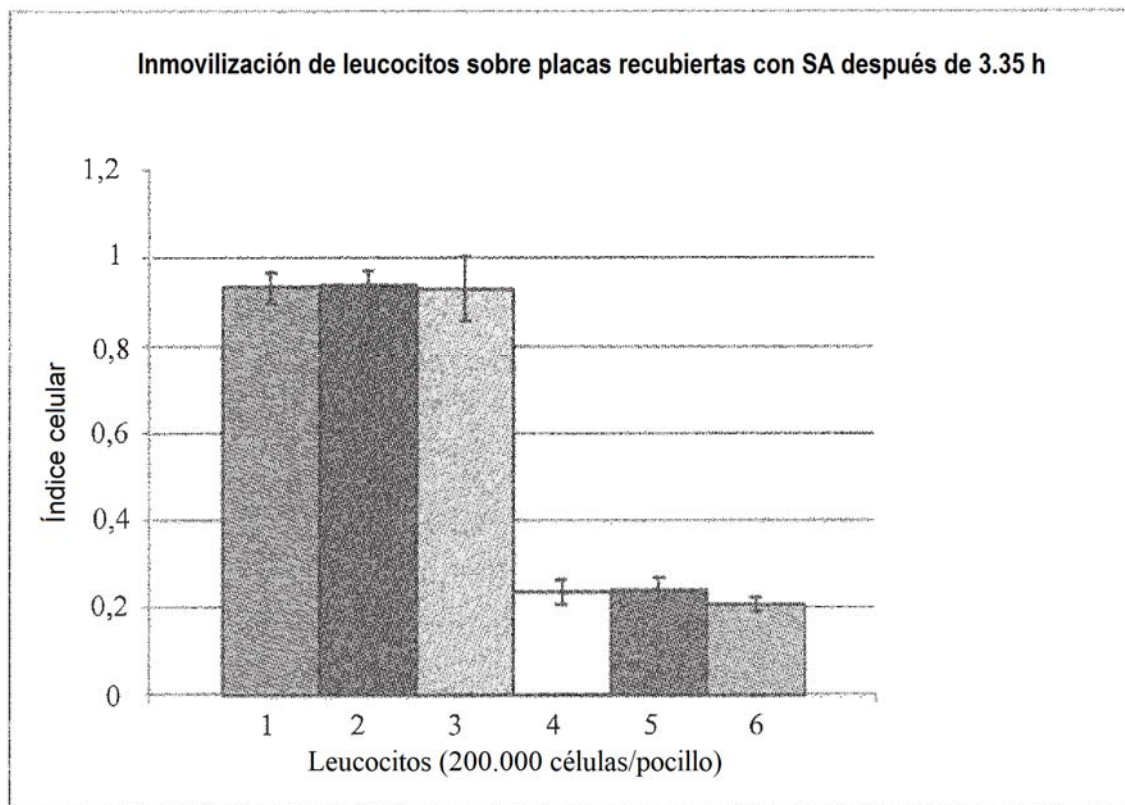


Figura 10

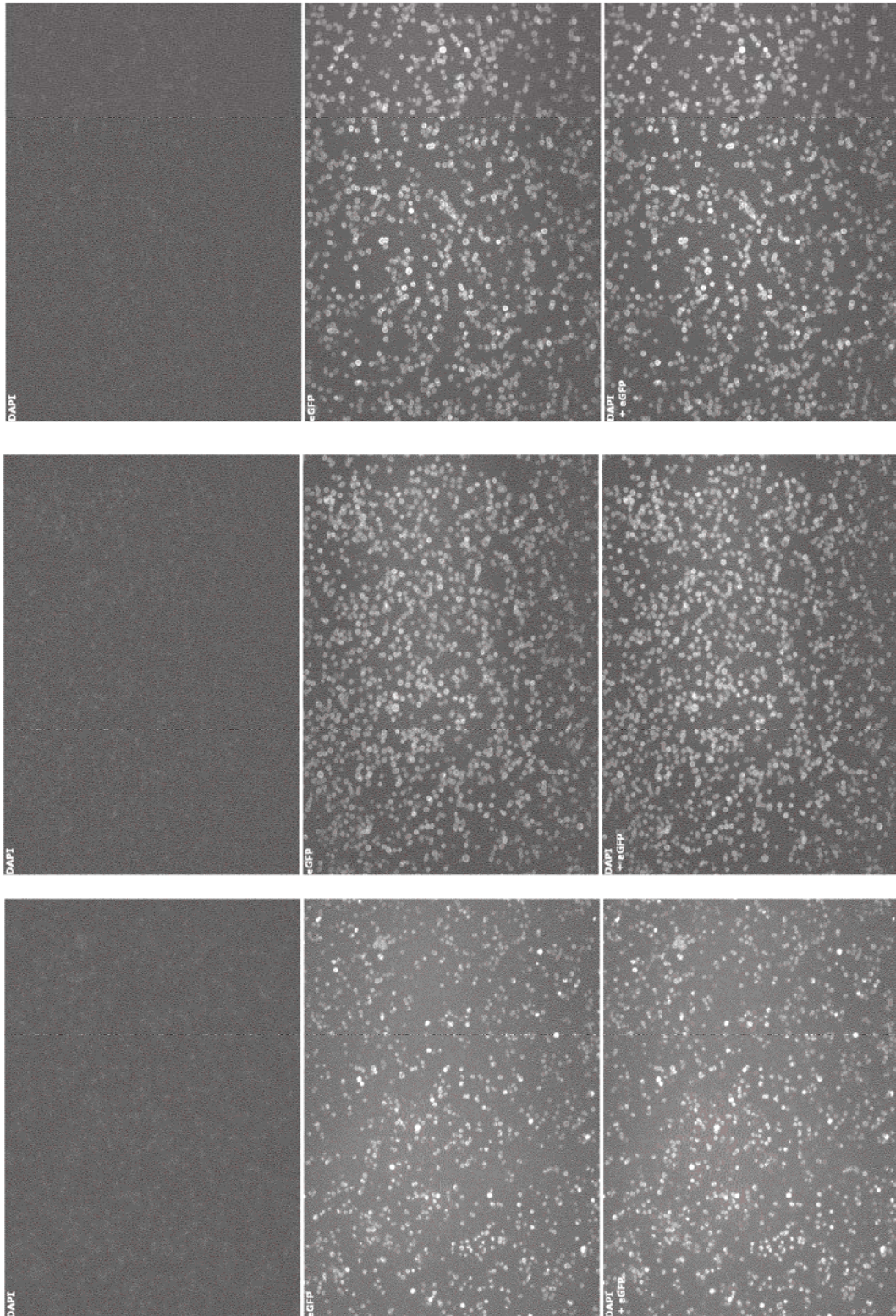


Figura 11

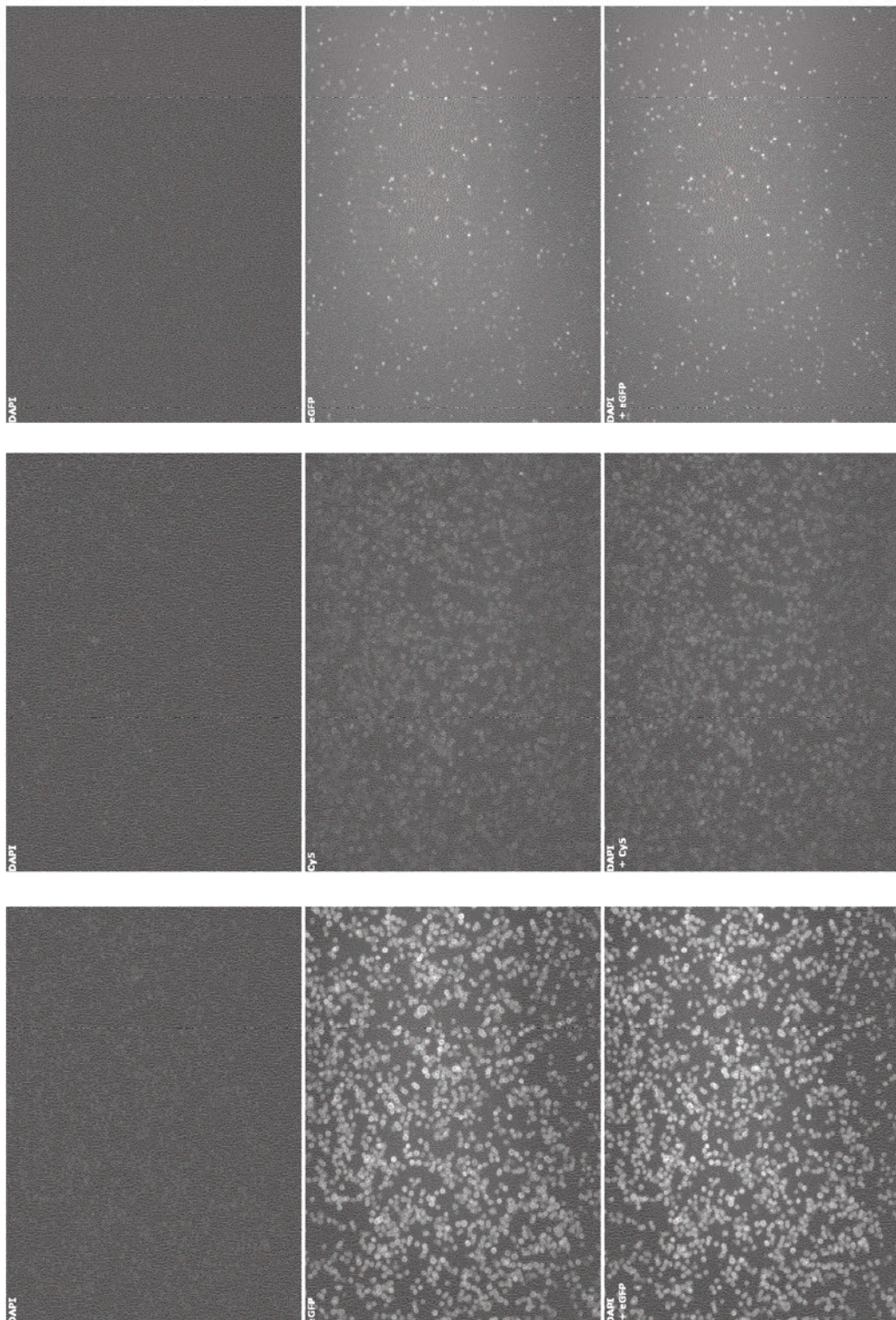
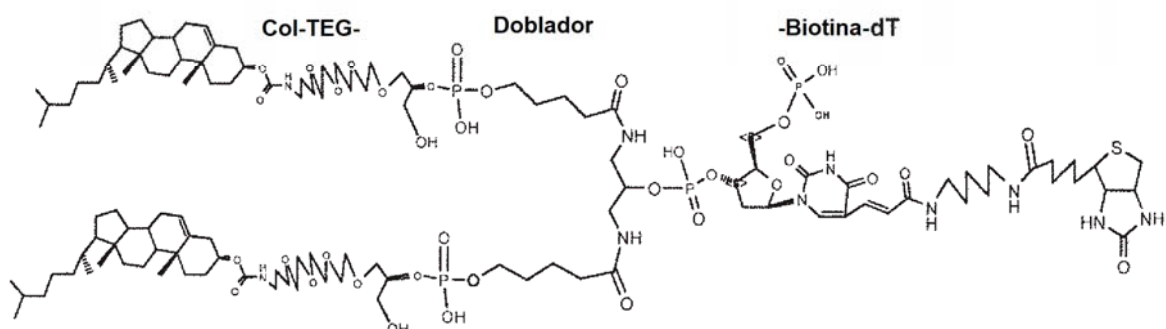


Figura 12

29891272 Col-TEG-Col-TEG-Doblador-Biotina-dT



29891227 Mir-Col-TEG-(Espaciador-C18)₇-Fluos-Biotina-TEG

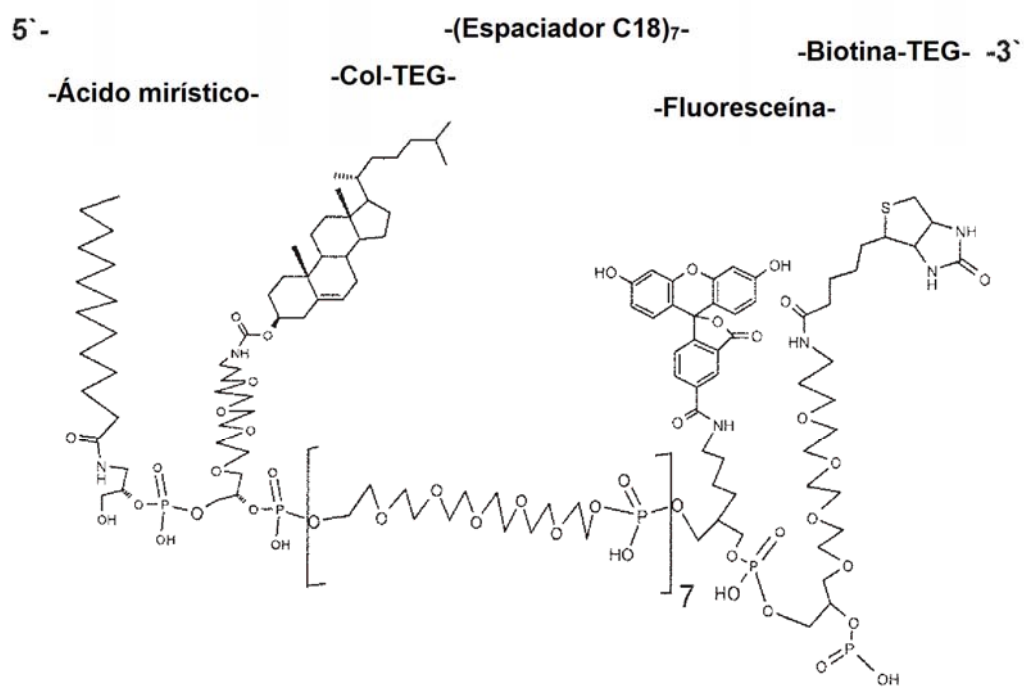
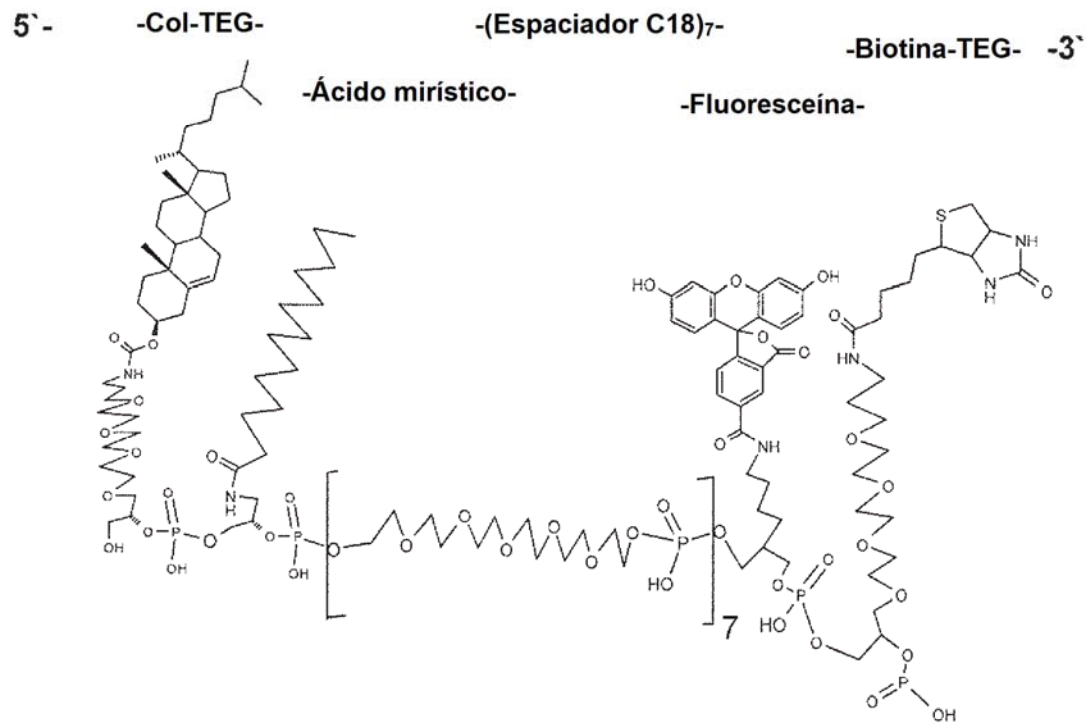


Figura 12 (continuación)

29891228 Col-TEG-Mir-(Espaciador C18)₇-Fluos-Biotina-TEG



29891180 Col-TEG-Col-TEG-PEG2000-Fluos-Biotina-TEG

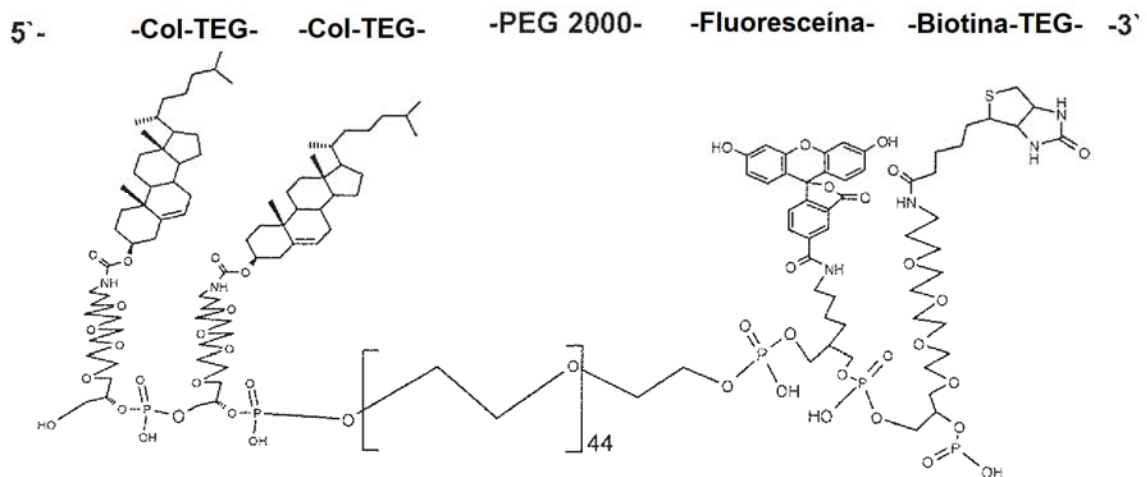
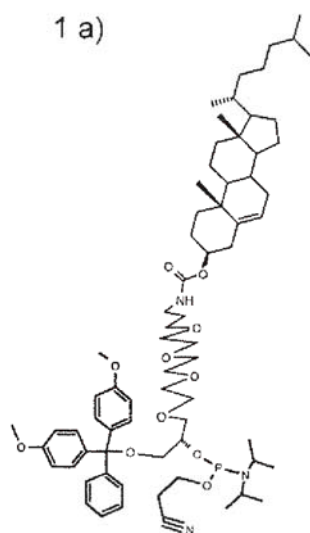


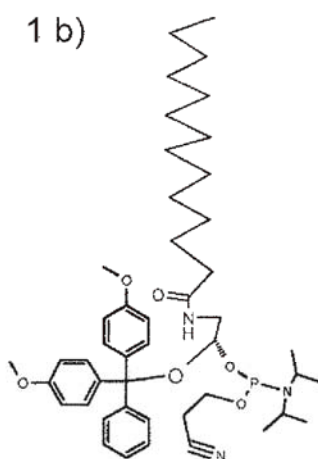
Figura 12 (continuación)

Fosforamiditas utilizadas para la síntesis:



Colesteril-TEG-CE-
fosforamidita

a) colesteril-TEG-CE-PA (GlenResearch 10-1975),

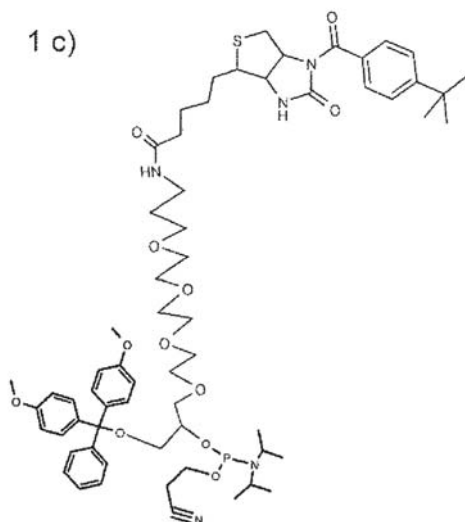


ácido mirístico-CE-
fosforamidita

b) ácido mirístico-CE-PA (producción en laboratorio)

Figura 12 (continuación)

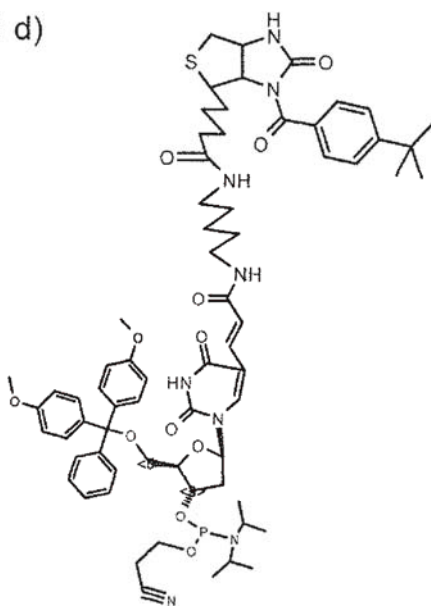
1 c)



Biotina-TEG-CE-
fosforamidita

c)biotina-TEG-CE-PA (GlenResearch 10-1955),

1 d)

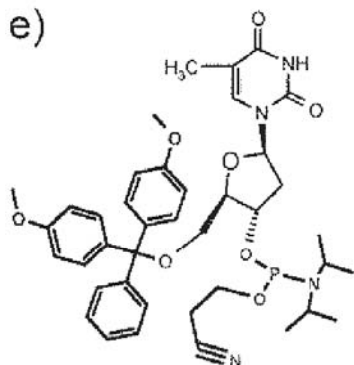


Biotina-dT-CR-
fosforamidita

d) biotina-dT-CE-PA (GlenResearch 10-1038),

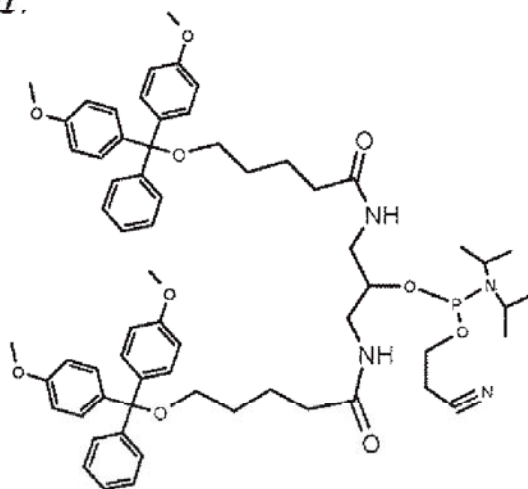
Figura 12 (continuación)

1 e)



dT-CE-
fosforamidita

1 f)

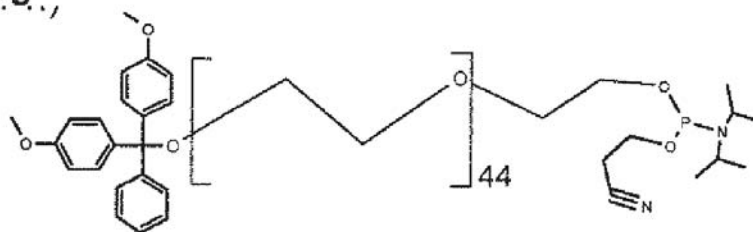


dobrador simétrico-CE-
fosforamidita

f) doblador simétrico-CE-PA (GlenResearch 10-1920),

Figura 12 (continuación)

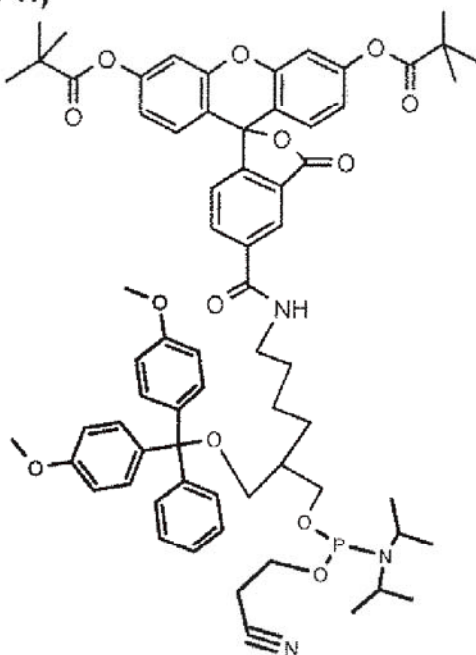
1 g.,



PEG-2000-CE-
fosforamidita

g) PEG-200-CED-PA (ChemGenes CLP-2119),

1 h)



6-Fluoresceína-CE-
fosforamidita

h) 6-Fluoresceína-CE-PA (GlenResearch 10-1964)

Figura 13

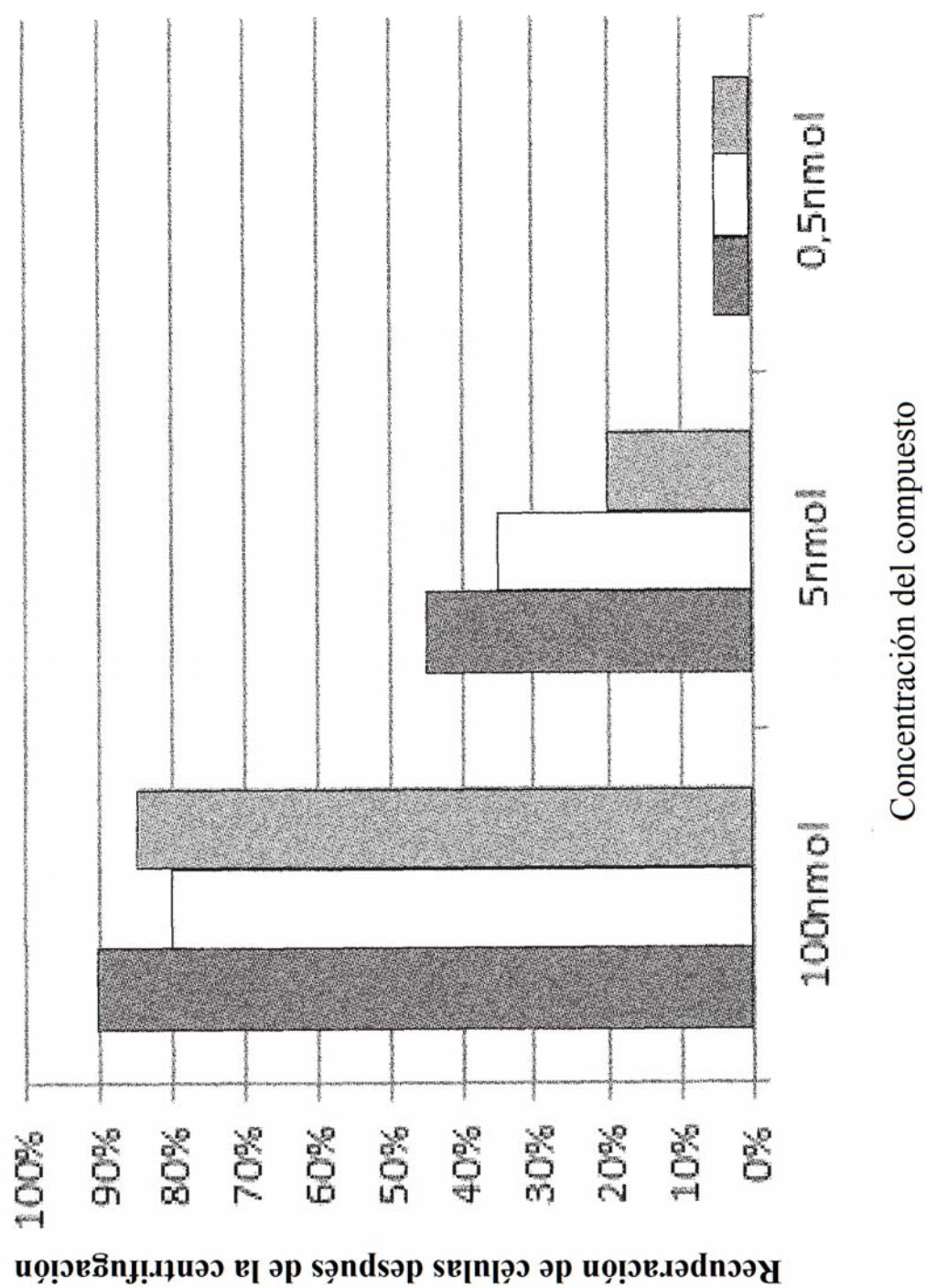


Figura 14

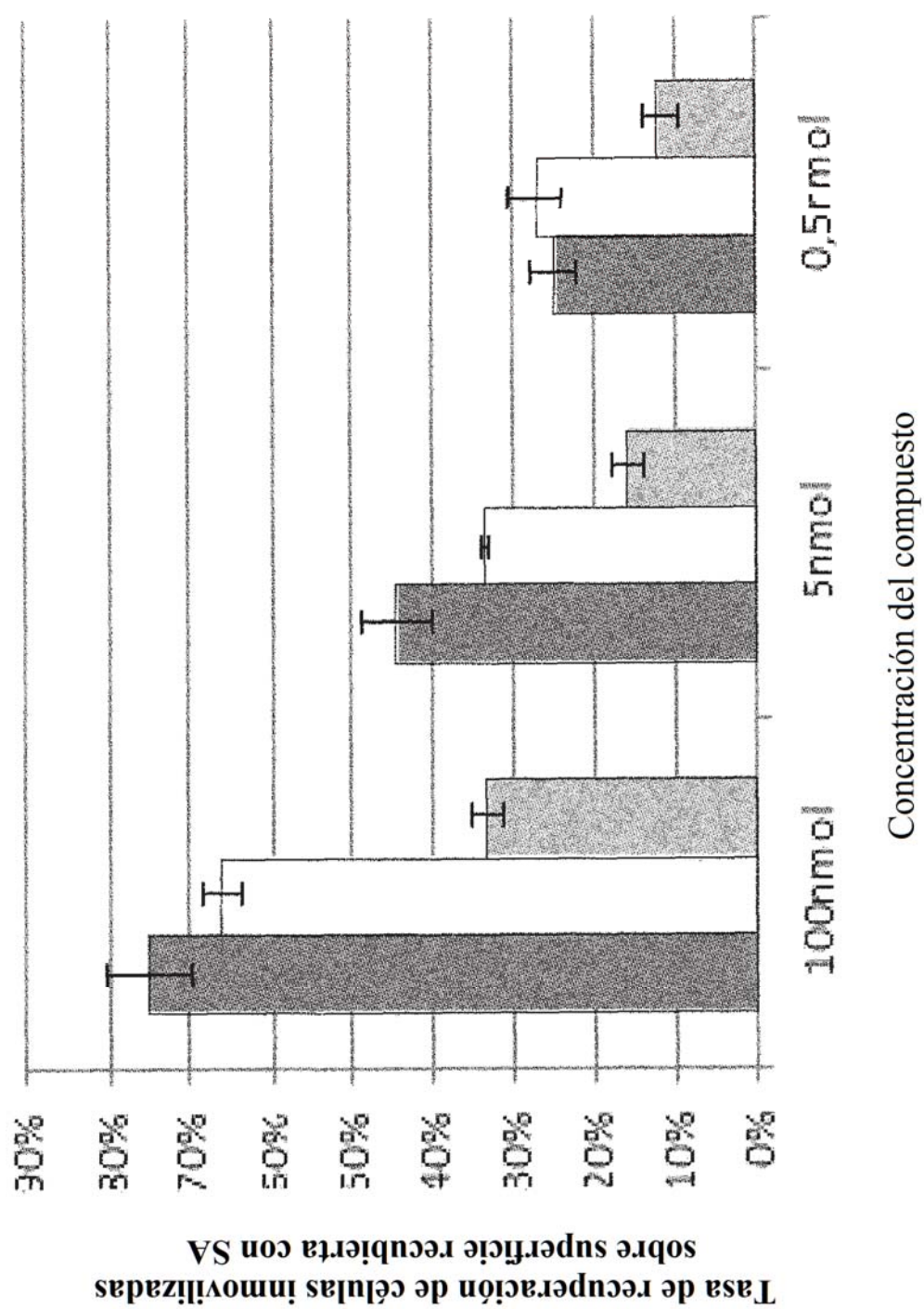


Figura 15

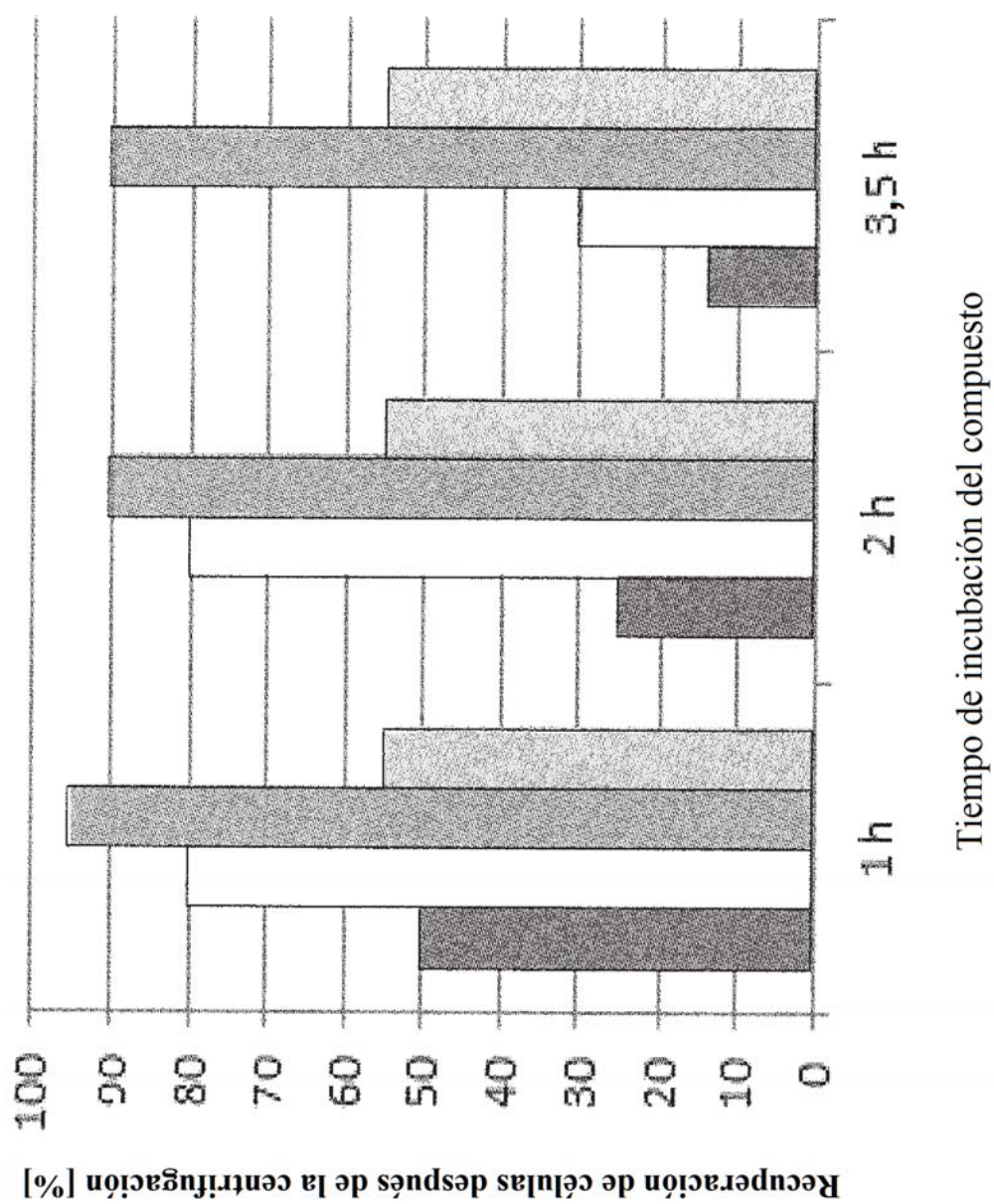


Figura 16

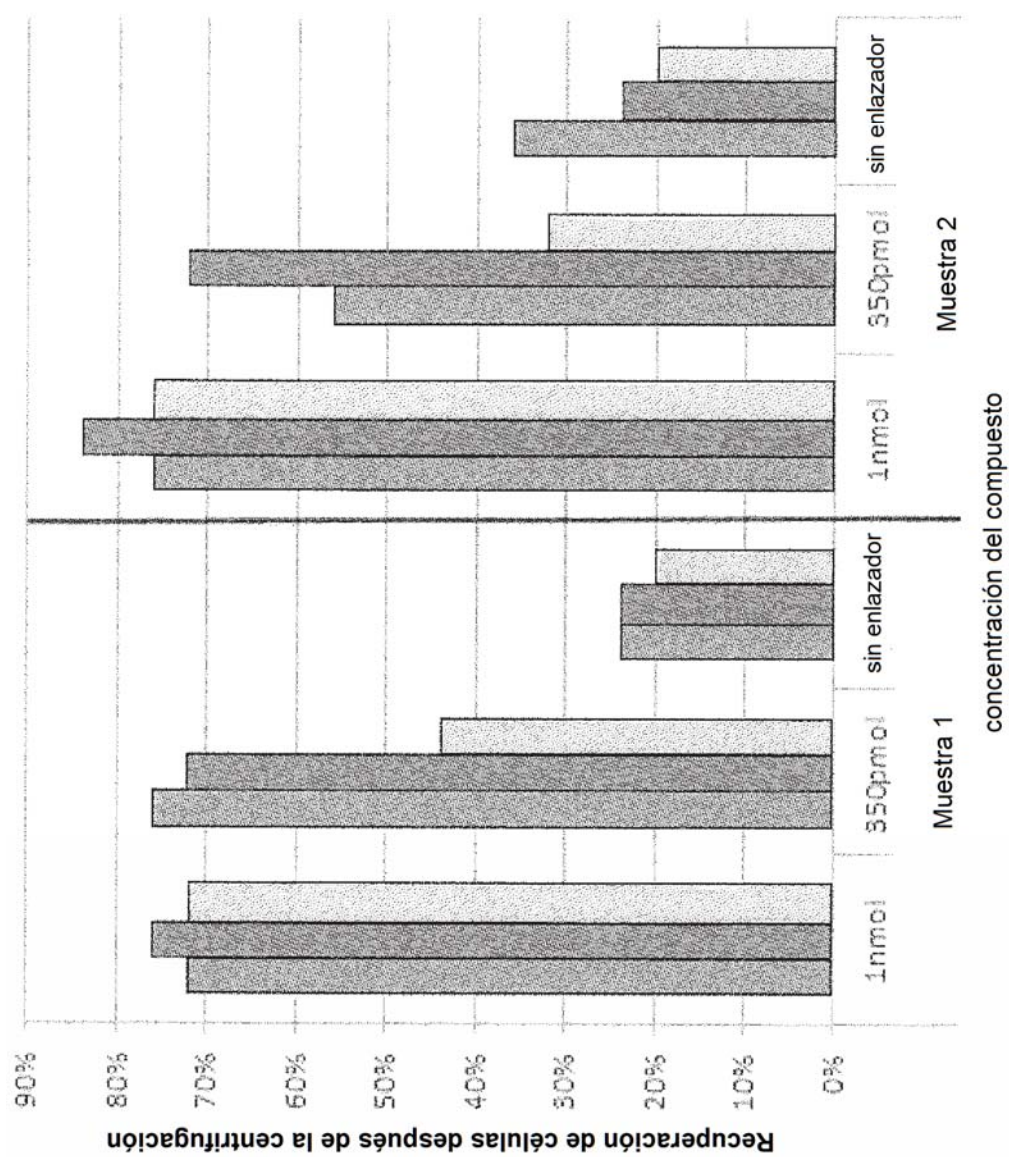


Figura 17

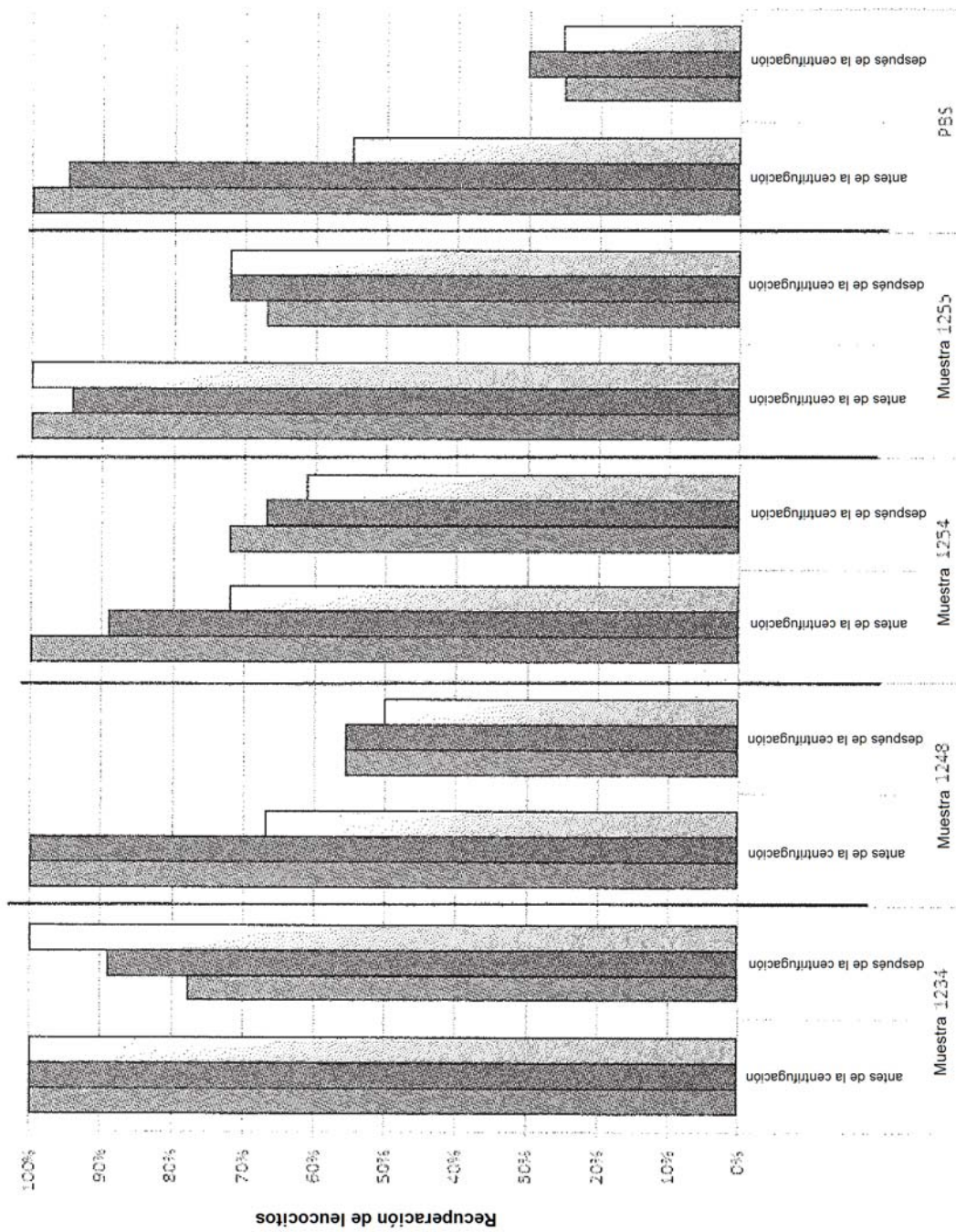


Figura 18

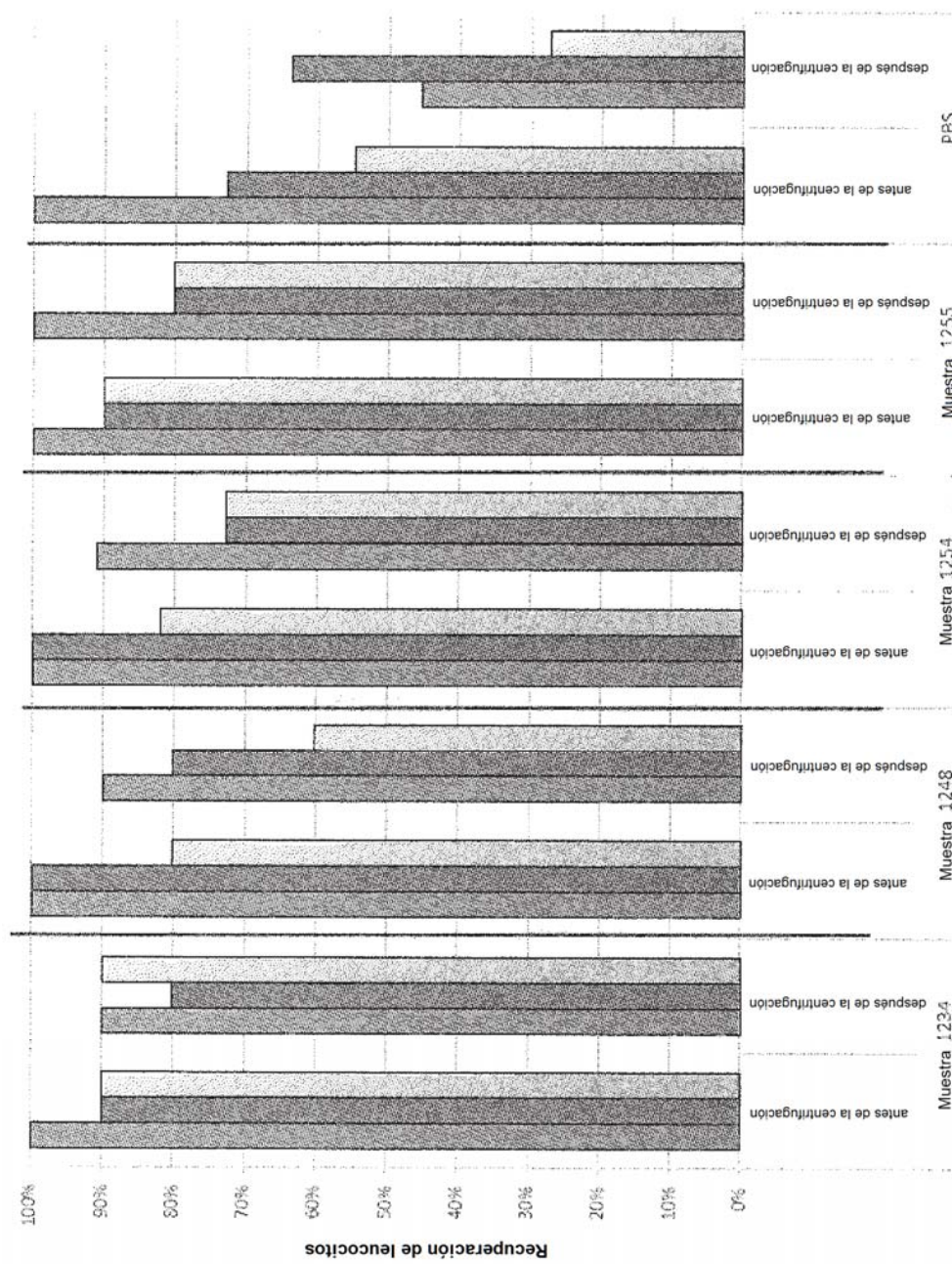


Figura 19

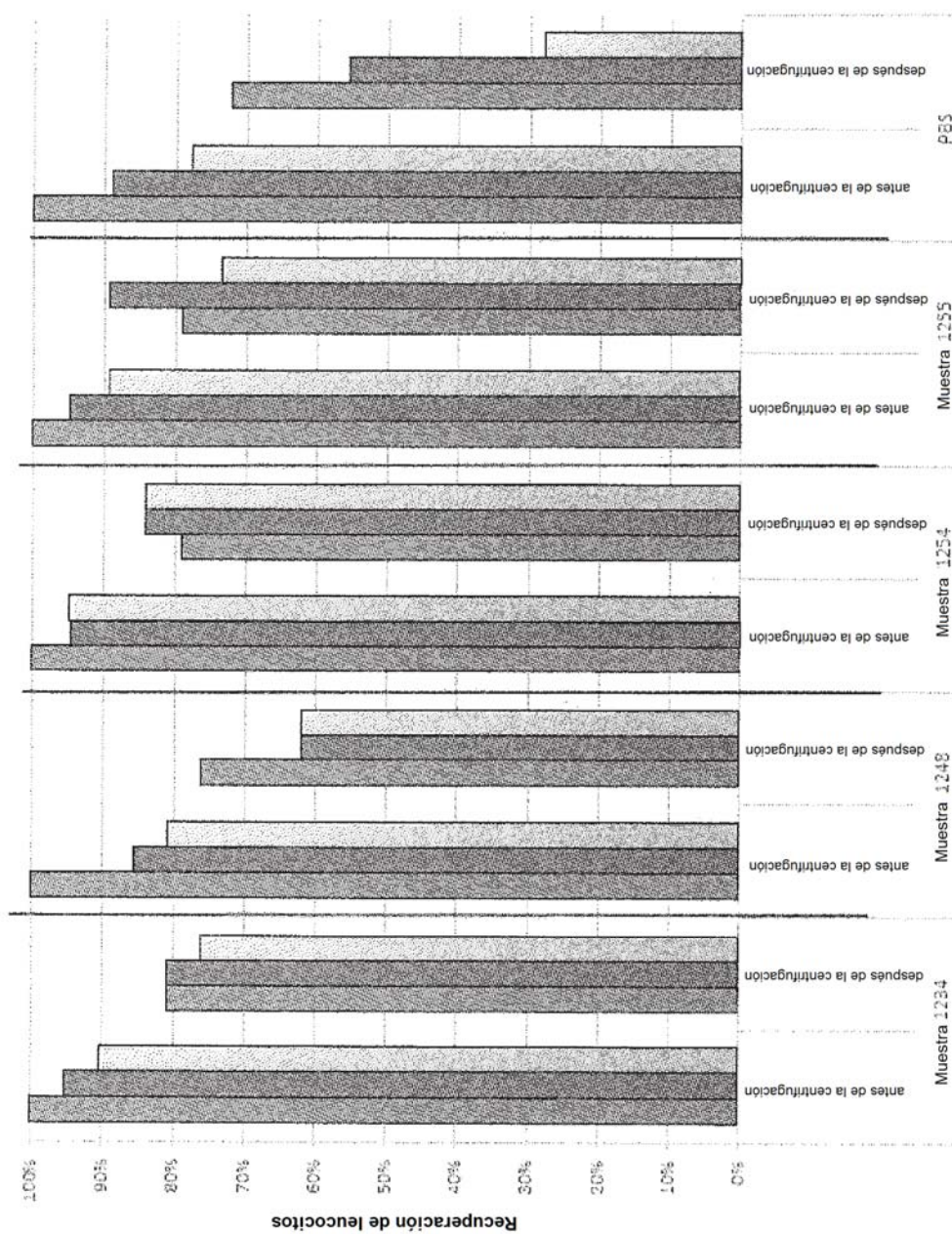


Figura 20

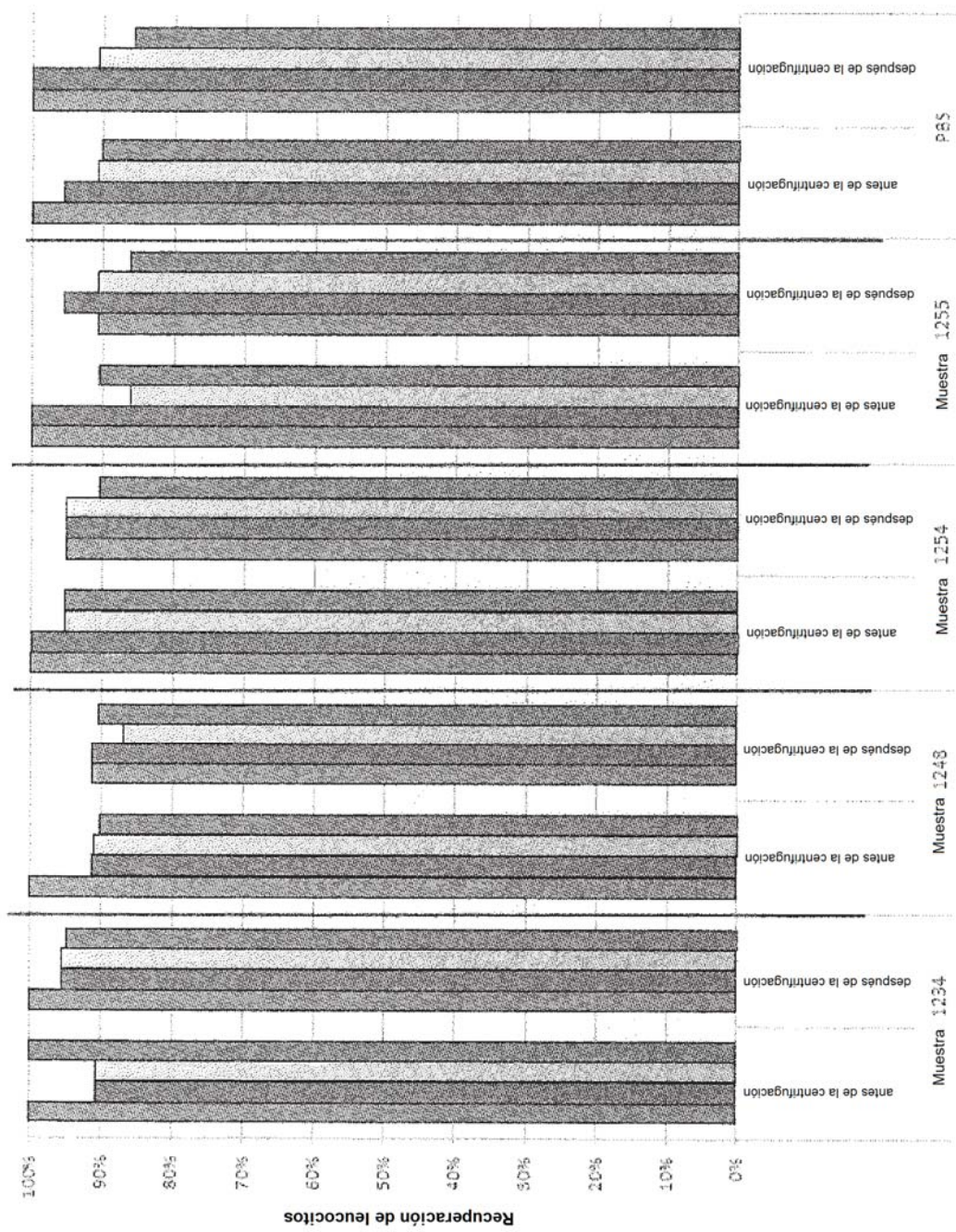


Figura 21

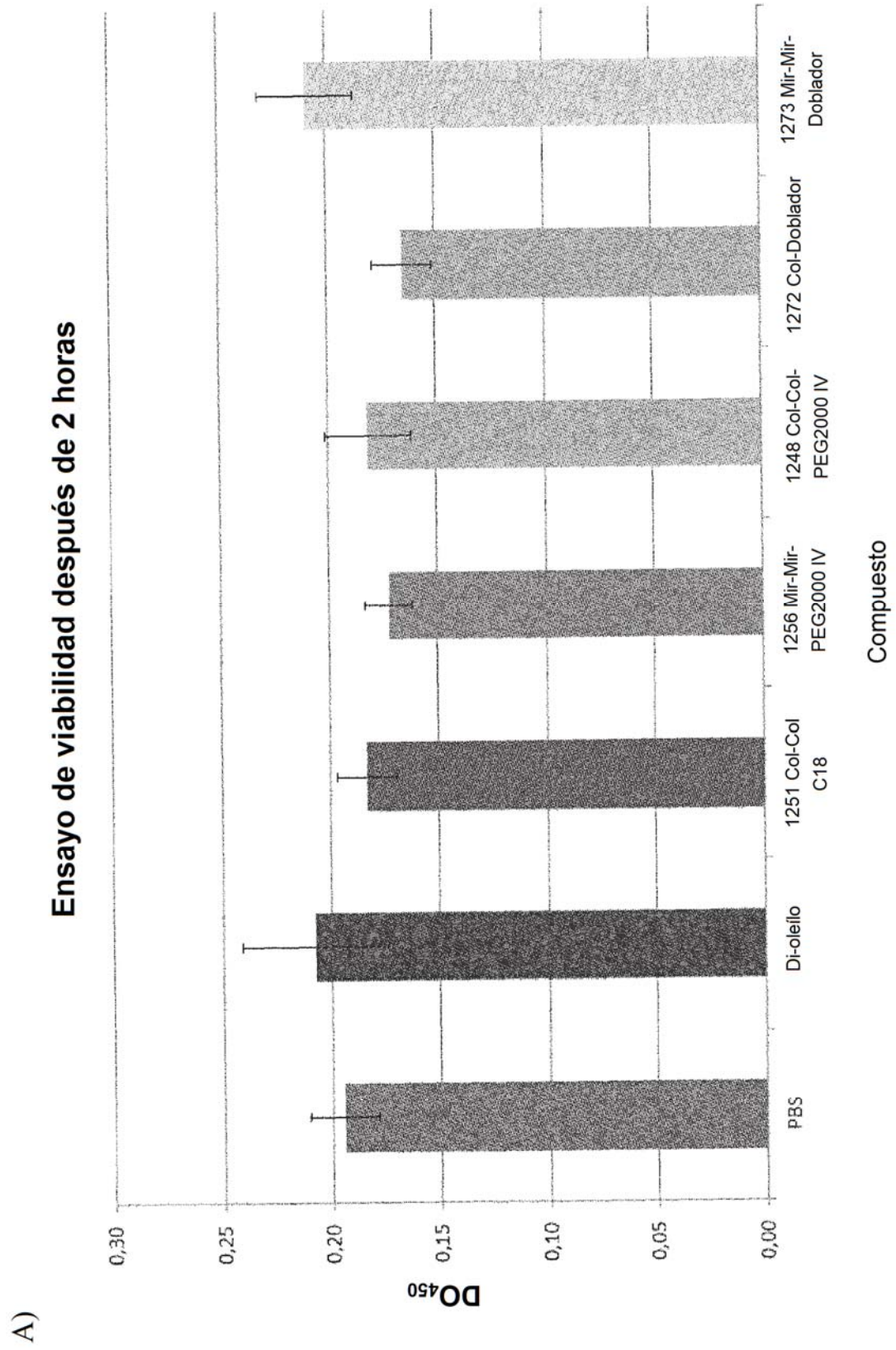


Figura 21 (continuación)

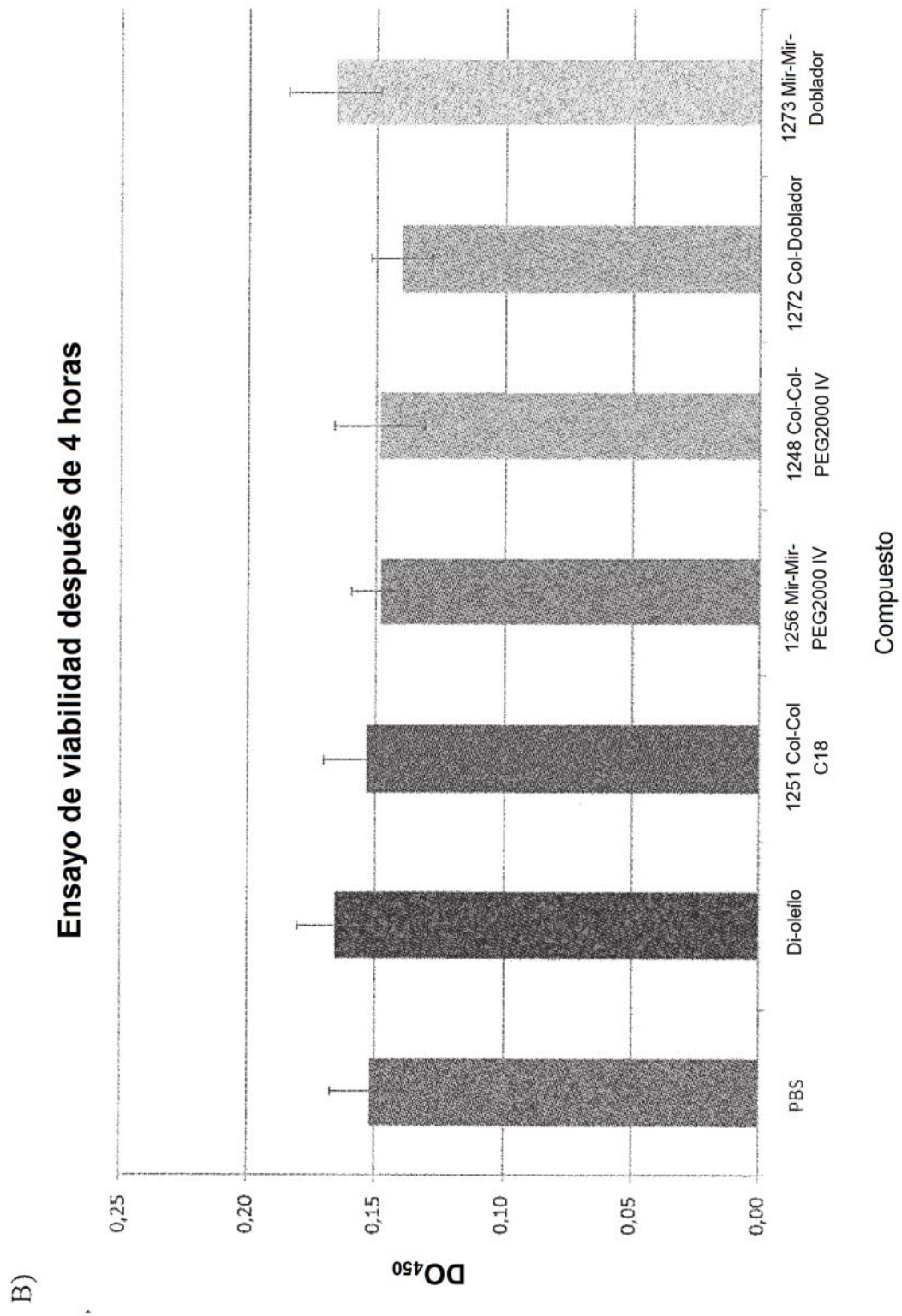


Figura 22

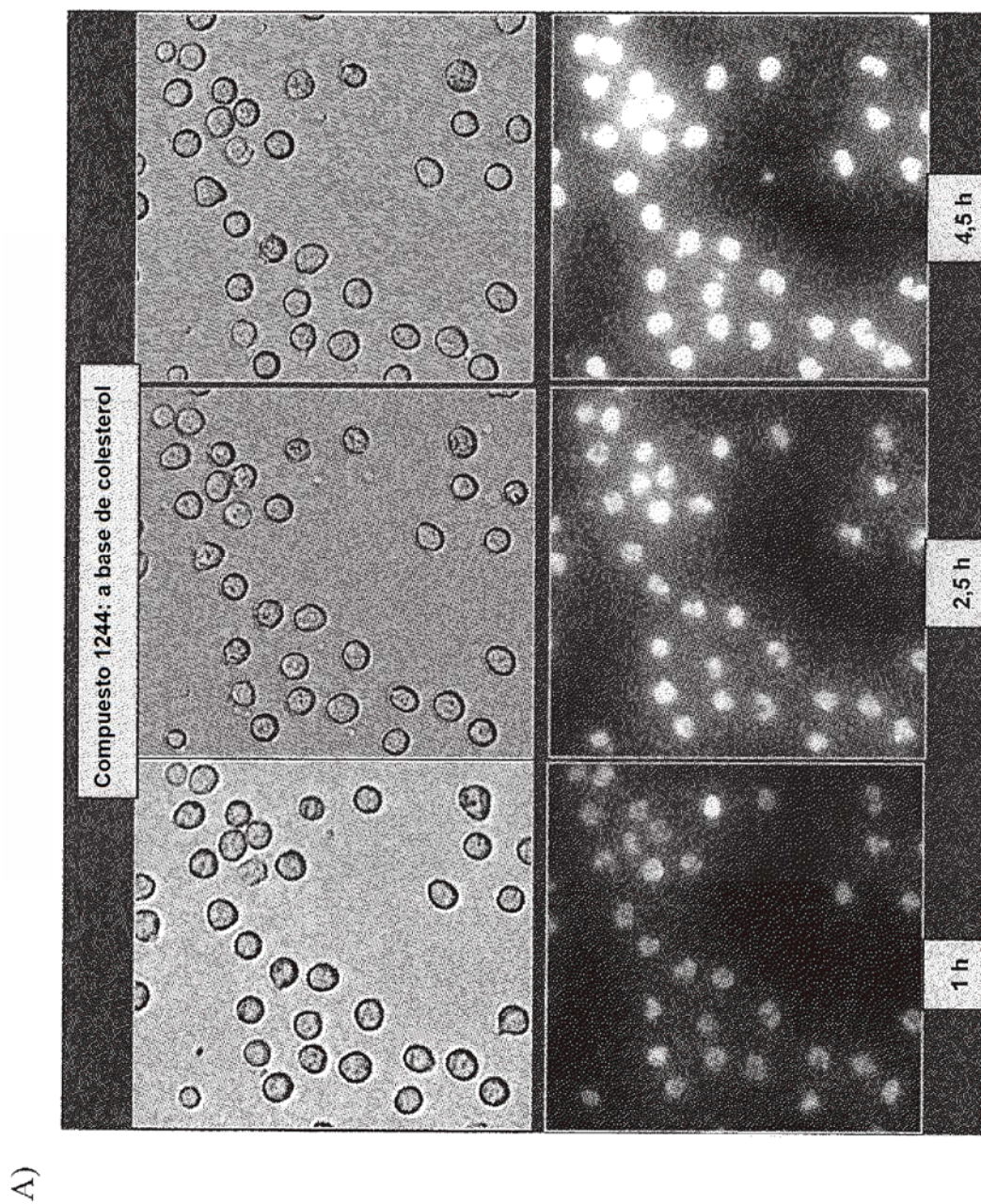


Figura 22 (continuación)

B)

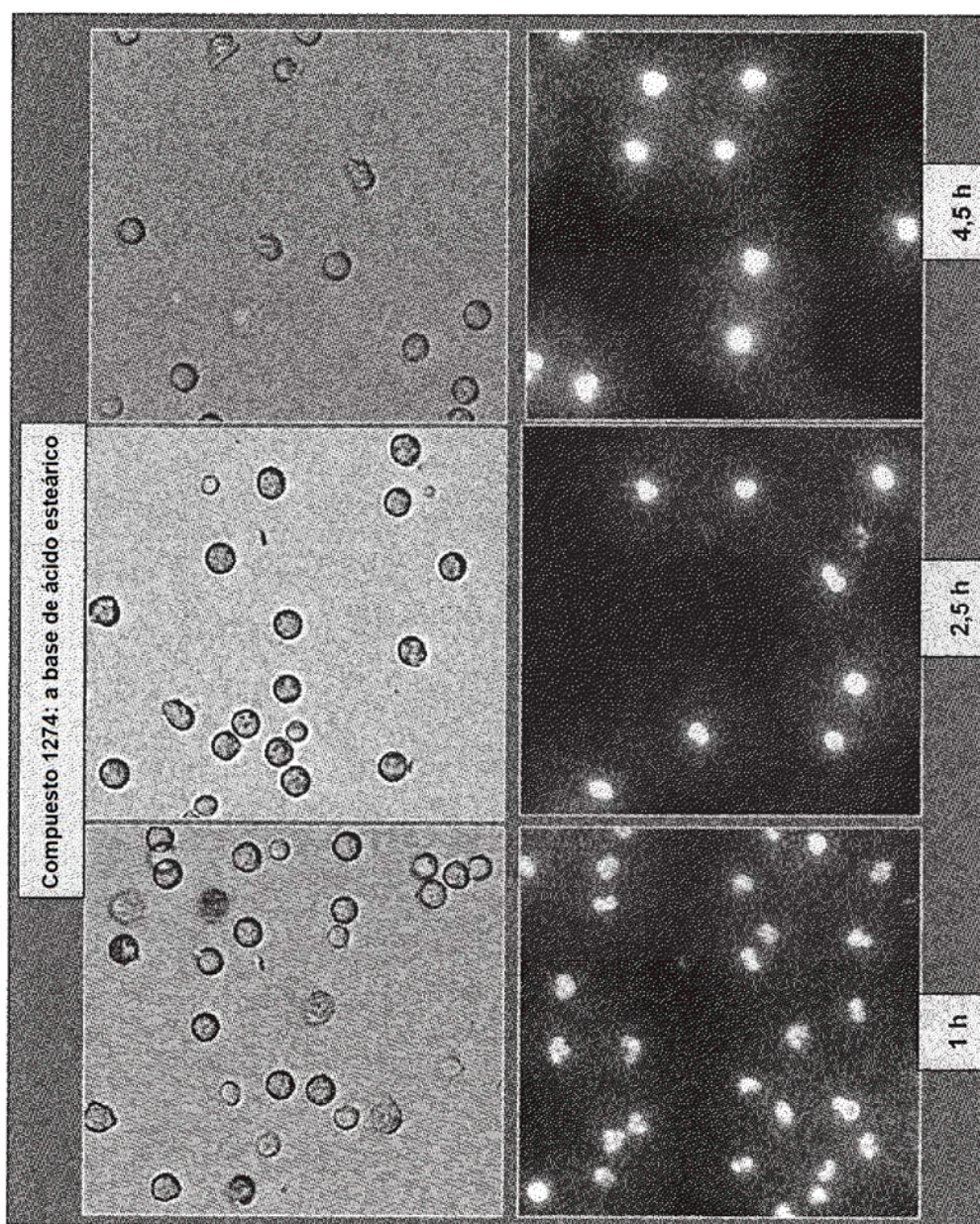


Figura 23

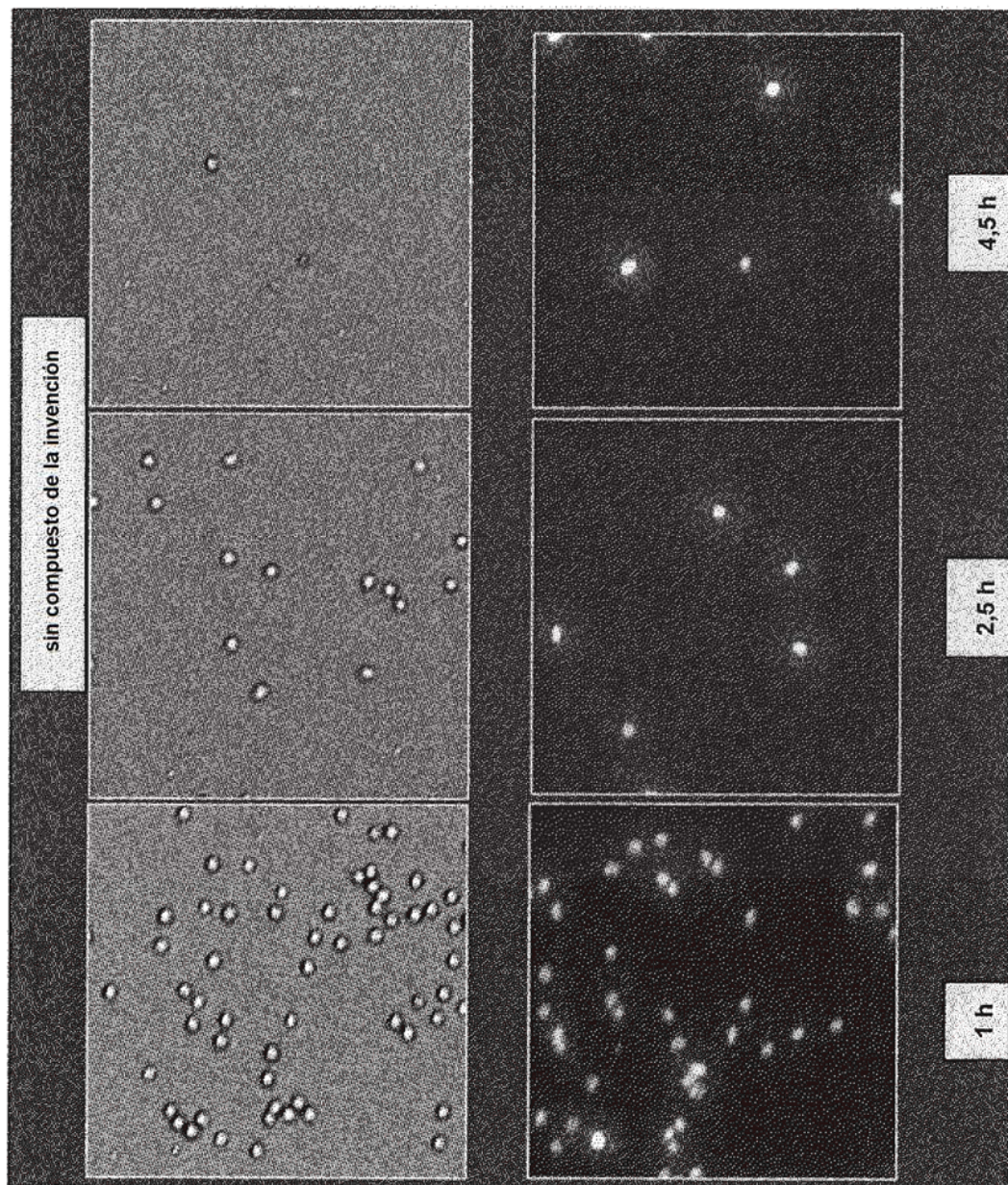


Figura 24

