

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 438**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/58** (2006.01)

**C07C 27/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/EP2015/053556**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15706439 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3111224**

54 Título: **Amplificación de señal de análogos de quinona metidas**

30 Prioridad:

**24.02.2014 US 201461943940 P**

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

**21.05.2019**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**BIENIARZ, CHRISTOPHER;  
ASHWORTH-SHARPE, JULIA;  
KELLY, BRIAN D. y  
POLASKE, NATHAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 713 438 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

Amplificación de señal de análogos de quinona metidas

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a precursores de análogos de quinona metidas novedosos y modos de realización de un procedimiento y un kit que comprende los mismos.

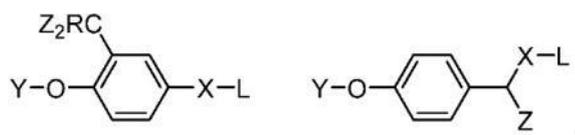
10 **Antecedentes**

La inmunohistoquímica (IHQ) se refiere a los procedimientos de detección, localización y/o cuantificación de antígenos, tales como una proteína, en una muestra biológica usando restos de unión específica, tales como anticuerpos específicos para los antígenos particulares. La IHQ proporciona la ventaja sustancial de identificar con exactitud donde se localiza una proteína particular dentro de la muestra tisular. También es un modo eficaz de examinar los propios tejidos. La hibridación *in situ* (ISH) se refiere al procedimiento de detección, localización y cuantificación de ácidos nucleicos. Tanto IHQ como ISH se pueden realizar en diversas muestras biológicas, tales como tejido (por ejemplo, recién congelado, fijado en formol, incluido en parafina) y muestras citológicas. El reconocimiento de las dianas se puede detectar usando marcadores (por ejemplo, cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes, radiométricos), independientemente de si la diana es un ácido nucleico o un antígeno. Para detectar, localizar y cuantificar consistentemente las dianas en un contexto clínico, la amplificación del acontecimiento de reconocimiento es deseable ya que la capacidad de detectar con seguridad marcadores celulares de baja abundancia se vuelve cada vez más importante para propósitos diagnósticos. Por ejemplo, depositar en los sitios del marcador cientos o miles de moléculas marcadoras en respuesta a una detección de antígeno individual potencia, a través de la amplificación, la capacidad de detectar el acontecimiento de reconocimiento.

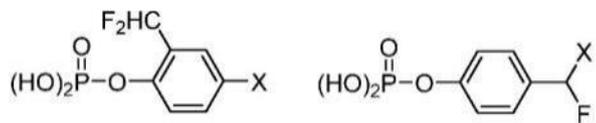
Los acontecimientos adversos acompañan a menudo a la amplificación, tal como señales inespecíficas que son aparentes como un incremento en la señal de fondo. Un incremento en la señal de fondo interfiere con el análisis clínico enmascarando señales débiles que se pueden asociar con expresiones bajas, pero clínicamente significativas. En consecuencia, aunque la amplificación de acontecimientos de reconocimiento es deseable, los procedimientos de amplificación que no incrementan la señal de fondo son altamente deseables. Un procedimiento de este tipo es la amplificación de la señal de tiramida (TSA), que también se ha denominado depósito de indicador catalizado (CARD). La patente de EE. UU. n.º 5.583.001 divulga un procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito usando un sistema de activación enzimática dependiente de analito que se basa en el depósito de indicador catalizado para amplificar la señal de marcador detectable. La catálisis de una enzima en un procedimiento de CARD o TSA se potencia haciendo reaccionar una molécula de fenol marcada con una enzima. Los procedimientos modernos que utilizan TSA incrementan eficazmente las señales obtenidas de los ensayos IHQ e ISH mientras que no producen una amplificación de señal de fondo significativa. Por ejemplo, la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 2012/0171668 divulga reactivos de amplificación de tiramida. A este respecto, el documento US 2012/171668 enseña además composiciones que contienen análogos de piridina o pirimidina como potenciadores para el depósito de conjugados de tiramida cerca de la diana en una muestra. Los reactivos para estos enfoques de amplificación se aplican a dianas clínicamente importantes para proporcionar capacidades de diagnóstico consistentes previamente inalcanzable (kit de amplificación OPTIVIEW<sup>®</sup>, Ventana Medical Systems, Tucson AZ, n.º catálogo 760-099).

La TSA se aprovecha de la reacción entre peroxidasa de rábano picante (HRP) y tiramida. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la tiramida se convierte en un intermedio radical altamente reactivo y de corta duración que reacciona preferentemente con residuos aminoácidos ricos en electrones en proteínas. A continuación se pueden detectar marcas detectables unidas covalentemente por una variedad de técnicas de visualización cromogénicas y/o por microscopía de fluorescencia. En inmunoensayos en fase sólida tales como IHQ e ISH, donde el contexto espacial y morfológico se valora altamente, la vida corta del intermedio radical da como resultado la unión covalente de la tiramida a proteínas en tejido en estrecha proximidad al sitio de generación, dando una señal discreta y específica. Aunque CARD define ampliamente el uso de una enzima indicadora dependiente de analito (ADRE) para catalizar la unión covalente de numerosos marcadores detectables a proteínas, la TSA basada en HRP es un enfoque comercialmente validado. No existen sistemas ADRE alternativos a pesar de la fuerte necesidad en el campo por sistemas de amplificación alternativos.

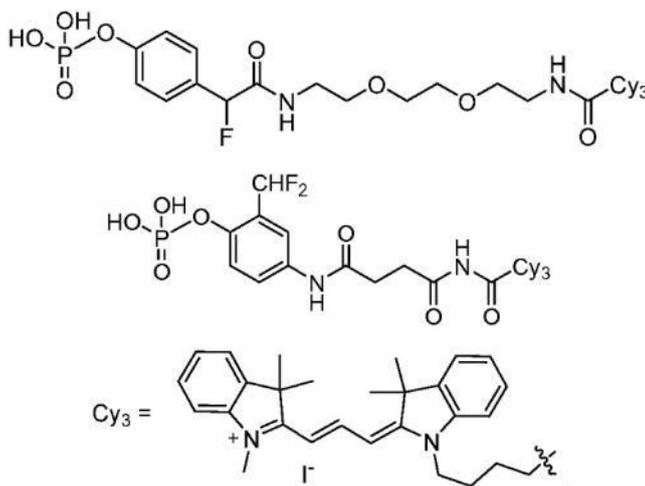
La patente de EE. UU. n.º 7.291.474 para Bobrow postula el uso de CARD basado en hidrolasa. En particular, Bobrow plantea la hipótesis de que se podían usar las sondas de actividad 2-difluorometilfenilo y ácido p-hidroximandélico como reactivos de amplificación. Zhu *et al.*, (2003) Tetrahedron Letters, 44, 2669-2672; divulgan sondas marcadas fluorescentemente que se dirigen específicamente a fosfatasas. Las sondas se diseñaron conjugando Cy3 a 2-difluorometilfenilo o p-hidroximandélico como unidad reactiva. El uso de 2-difluorometilfenilo y ácido p-hidroximandélico también se describió por Lo *et al.*, (2002) J. Proteome Res., 1, 35-40; Cesaro-Tadic *et al.*, (2003) Nature Biotechnology, 21, 679-685; Janda *et al.*, (1997) Science 275, 945-948; Halazy *et al.*, (1990) Bioorganic Chemistry 18, 330-344; y Betley *et al.*, (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41, 775-777. Las estructuras sugeridas de Bobrow incluyeron las siguientes:



5 en las que Y es un resto que se puede escindir por una enzima hidrolítica; L es un marcador detectable; X es un grupo conector; Z es un halógeno; y R es hidrógeno, alquilo o halógeno. En modos de realización específicos, R es hidrógeno y los grupos Z son flúor. Estas estructuras son generalizaciones de las estructuras particulares divulgadas por Zhu *et al.*, (2003) Tetrahedron Letters, 44, 2669-2672. En particular, Zhu *et al.* describe las siguientes estructuras como inhibidores de fosfatasa conocidos:



10 En base a estos inhibidores de fosfatasa, Zhu *et al.* desarrollaron las siguientes sondas de actividad:



15 Zhu divulga que el perfil basado en actividad de las proteínas es una herramienta comprobada y potente en estudios proteómicos, por lo que las subclases de proteínas enzimáticas se pueden identificar de forma selectiva. Como tal, Zhu desarrolló las sondas de actividad para señalar la presencia de las enzimas fosfatasas alcalinas. La estrategia de Zhu se aprovecha de sondas específicas que reaccionan con diferentes clases de enzimas, lo que da lugar a la formación de complejos sonda-proteína covalentes que se distinguen fácilmente de otras proteínas no reactivas en una mezcla de proteoma bruta.

20 Zhu *et al.* establecen que es conocido que el fosfato de 2-difluorometilfenilo fue un inhibidor de fosfatasa general contra un amplio espectro de diferentes fosfatasas, incluyendo fosfatasas alcalinas y ácidas. Se produce inhibición a medida que las fosfatasas catalizan la escisión del grupo fosfato para generar un intermedio reactivo después de que salga un ion flúor. El intermedio reactivo reacciona con el sitio activo de la enzima para unir covalentemente un fluoróforo al sitio activo de la enzima. Pero al hacer eso, también inhibe la capacidad de la enzima para escindir hidrolíticamente además los fosfatos.

25 Se entiende que el uso de inhibidores enzimáticos en un esquema de amplificación para unir covalentemente restos generadores de señal a un sustrato es autolimitante ya que la generación de la señal unida puede destruir la capacidad de la enzima. Ha existido un reconocimiento en la técnica de que demandar potenciaciones hechas a estos reactivos probablemente sería contraproducente ya que la mejora en el comportamiento (por ejemplo, recambio, especificidad) daría como resultado una destrucción más eficaz del sitio activo de la enzima. Por tanto, para obtener una amplificación de señal uniendo múltiples restos generadores de señal, en primer lugar se han de unir múltiples enzimas de forma proximal a la diana. En consecuencia, los compuestos divulgados por Zhu *et al.* y Bobrow nunca se han desarrollado en un reactivo de detección comercialmente viable para un sistema de amplificación para IHQ o ISH.

30 Además, los enfoques de amplificación descritos hasta ahora permiten el depósito de compuestos fluorescentes. La obtención de imágenes de fluorescencia a menudo se implementa ya que es extraordinariamente sensible; la detección de muy pocas moléculas fluoróforas es ahora habitual. Sin embargo, esta sensibilidad se logra usando obtención de imágenes en campo oscuro, lo que tiene determinadas limitaciones pragmáticas. Por ejemplo, la

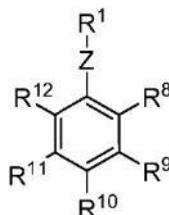
tinción primaria en campo claro (por ejemplo, tinción con hematoxilina y eosina) no se puede observar simultáneamente, lo que hace más difícil correlacionar la señal fluorescente con rasgos morfológicos. Es bien conocido que la detección basada en fluorescencia es habitualmente 1000 veces más sensible que los enfoques basados en absorbancia-reflectancia (por ejemplo, detección basada en cromógenos). Como tal, una metodología apropiada para detección de fluorescencia requeriría una mejora de 1000 veces para su uso como metodología de detección cromogénica. Un incremento en el comportamiento de un sistema de detección basado en enzimas en 1000 veces no es trivial. Hasta la fecha, solo sistemas basados en tiramida han logrado este incremento en el comportamiento.

Aunque están disponibles reactivos consistentes, persiste la necesidad de obtener enfoques de amplificación de señal alternativos que produzcan una amplificación consistente sin incrementar las señales de fondo. Además, son deseables procedimientos para amplificar la detección de dos o más dianas distintas en una muestra de tejido.

### Sumario

Los precursores de análogos de quinona metidas (QMP) y modos de realización para el uso de estos QMP divulgados en el presente documento proporcionan resultados sustancialmente superiores a los divulgados en la técnica anterior. Los QMP separan la función del marcador detectable de la generación de quinona metida y las funciones de estabilización nucleófila dentro de la molécula. También se divulgan en el presente documento modos de realización de un procedimiento para utilizar los QMP para tinción IHQ y/o ISH en tejido, tal como tejido incluido en parafina fijado en formol (FFPE). Hasta el conocimiento de los inventores, esto no se ha demostrado con éxito antes. Los modos de realización del procedimiento de uso de QMP para amplificar la detección de una o más dianas distintas en una muestra de tejido proporcionan una mejora de la calidad de señal y reducción de tinción colateral, en comparación con los procedimientos distintos de QMP previamente conocidos. Cuando se usa el procedimiento divulgado para detectar múltiples dianas, de forma simultánea o bien secuencial, las dianas se pueden detectar por procedimientos de detección basados en cromógenos o fluorescencia, o una combinación de los mismos.

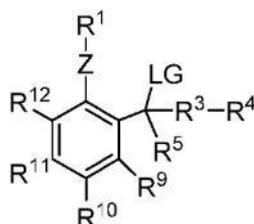
En algunos modos de realización, un QMP tiene una fórmula



o una sal o solvato del mismo, donde Z es O, S o NR<sup>a</sup> y R<sup>1</sup> es un fosfato, o ZR<sup>1</sup> es un fosfato; R<sup>8</sup> es -C(LG)(R<sup>5</sup>)(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>); R<sup>9</sup>, R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, halo, ciano, alifático, alcoxi, NO<sub>2</sub>, N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, arilo, haloalquilo, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup>, -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, -R<sup>3</sup>R<sup>4</sup> o dos grupos adyacentes conjuntamente forman un anillo alifático o anillo arilo; y R<sup>10</sup> es hidrógeno, halo, ciano, alifático, alcoxi, NO<sub>2</sub>, N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, arilo, haloalquilo, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup>, -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, -R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, -C(LG)(R<sup>5</sup>)(R<sup>6</sup>) o con uno de R<sup>9</sup> o R<sup>11</sup> forman un anillo alifático o anillo arilo.

Además con referencia a la fórmula, LG es un grupo saliente; R<sup>3</sup> es un conector o un enlace; R<sup>4</sup> es un marcador detectable; cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquilo inferior, haloalquilo inferior, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup> o -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>; cada R<sup>6</sup> es independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquilo inferior, haloalquilo inferior, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup> o -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>; R<sup>a</sup> es hidrógeno o alifático; y cada R<sup>c</sup> independientemente es hidrógeno, arilo, alifático o heteroalifático, o dos restos R<sup>c</sup> conjuntamente forman un anillo heteroalifático. Adicionalmente, al menos uno de R<sup>8</sup> y R<sup>10</sup> comprende LG, y al menos uno de R<sup>8</sup> y R<sup>10</sup> comprende o consiste en R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, y si LG es halo, entonces R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> no son halo.

En determinados modos de realización, el QMP tiene la fórmula



Z puede ser O y/o ZR<sup>1</sup> puede ser -OP(O)(OH)<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, -NHC(O)R, -OC(O)CH<sub>3</sub>, -OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>,

-OS(O)<sub>2</sub>OH, OCH<sub>3</sub> o una sal de los mismos. En algunos modos de realización, el glúcido es α-glucosa, β-glucosa, α-galactosa, β-galactosa, α-glucuronosa o β-glucuronosa.

5 LG puede ser cualquier grupo saliente adecuado, tal como un haluro, éster de sulfato, carboxilato, éster inorgánico, tiolato, amina, ariloxi, alcoxi o heteroarilo. En algunos modos de realización, LG es fluoruro, cloruro, ácido, acetato, metoxi, etoxi, isopropoxi, fenóxido, -OS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -OS(O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, -OS(O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -OS(O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CX<sub>3</sub>, -OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -N<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NC<sub>5</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>, -O-alquilo, -OC(O)alquilo, -OC(O)H, -N(R<sup>b</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup> o 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO), donde cada X independientemente es fluoro, cloro, bromo o yodo, y cada R<sup>b</sup> independientemente es hidrógeno, o alquilo inferior, o dos restos R<sup>b</sup> conjuntamente forman un anillo heteroalifático. En determinados modos de realización, LG es F.

15 Determinados modos de realización del procedimiento divulgado comprenden poner en contacto una muestra biológica con una primera sonda de detección específica para una primera diana. La muestra biológica se pone en contacto con un primer conjugado marcador que comprende una primera enzima. La muestra biológica también se pone en contacto con un primer QMP que comprende un primer grupo de reconocimiento de enzima y un primer marcador detectable. La primera enzima escinde el primer grupo de reconocimiento de enzima, convirtiendo de este modo el primer QMP en un primer análogo de quinona metida (QM) reactiva, que se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directamente en la primera diana. Poner en contacto la muestra biológica comprende (i) poner en contacto la muestra biológica con el primer QMP a una concentración de precursor, eficaz para dar el nivel deseado de amplificación, tal como una concentración de más de cero a 1 mM; (ii) poner en contacto la muestra biológica con el primer QMP a un pH eficaz para reducir la difusión y/o tinción colateral hasta una cantidad deseada, tal como un pH de más de 7 a 14, o de 8 a 12; (iii) poner en contacto la muestra biológica con el primer QMP en presencia de una sal, tal como cloruro de magnesio, a una concentración de sal eficaz para reducir la difusión y/o tinción colateral hasta una cantidad deseada, típicamente de 0,1 M a 2 M, o de 0,5 M a 1,25 M; (iv) poner en contacto la muestra biológica con un compuesto divulgado en el presente documento; o (v) cualquier combinación de los mismos. A continuación se detecta la primera diana detectando el primer marcador detectable. El procedimiento puede ser un procedimiento automatizado.

30 La concentración de precursor puede ser de 50 μM a 500 μM para tinción cromógena, o de 50 nM a 10 μM para tinción fluorescente y amplificación con hapteno.

35 En algunos ejemplos, el primer conjugado marcador comprende un anticuerpo acoplado a la primera enzima. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-especie o anti-hapteno. El primer conjugado marcador se puede asociar, directa o bien indirectamente, con la primera sonda de detección. La primera sonda de detección puede comprender un hapteno o un anticuerpo anti-especie y la primera sonda marcadora comprende un correspondiente anti-hapteno o un segundo anticuerpo anti-especie. La primera enzima y el primer grupo de reconocimiento de enzima pueden ser cualquier enzima y grupo de reconocimiento de enzima adecuados que interactuarán para formar una QM.

40 La primera QM reactiva reacciona con un nucleófilo dentro de la muestra biológica, el primer conjugado marcador, la primera sonda de detección, o combinaciones de los mismos. Los nucleófilos típicos comprenden un grupo amino, sulfhidrilo o hidroxilo en un aminoácido, residuo de ácido nucleico o carbohidrato.

45 El procedimiento puede ser un procedimiento multiplexado. En algunos modos de realización, además de detectar una primera diana, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra biológica con un segundo resto de unión específico para una segunda diana. La segunda diana se marca con una segunda enzima a través del segundo resto de unión. La muestra biológica se pone en contacto con un segundo compuesto precursor de detección que interactúa con la segunda enzima para depositar un segundo compuesto de detección directamente en o de forma proximal a la segunda diana. El segundo compuesto de detección se detecta a continuación. La primera enzima y segunda enzima típicamente son enzimas diferentes. Poner en contacto la primera y segunda dianas con los respectivos restos de unión y/o detectar el primer y segundo compuestos de detección se puede producir se forma secuencial o de forma sustancialmente contemporánea.

50 En determinados modos de realización, la primera enzima reacciona selectivamente con el primer QMP, y la segunda enzima reacciona selectivamente con el segundo compuesto precursor de detección. En modos de realización particulares, la primera enzima es una fosfatasa alcalina y el primer grupo de reconocimiento de enzima es un fosfato. La segunda enzima puede ser una peroxidasa.

55 En algunos modos de realización, el segundo compuesto precursor de detección es un segundo QMP que comprende un segundo grupo de reconocimiento de enzima y un segundo marcador detectable. El segundo QMP interactúa con la segunda enzima para formar una segunda QM que se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directamente en la segunda diana. Típicamente, la segunda enzima es una enzima diferente de la primera, tal como una β-galactosidasa donde el segundo grupo de reconocimiento de enzima es un β-galactósido.

60 Un experto en la técnica entenderá que el procedimiento se puede expandir para incluir la detección de distintas dianas adicionales. Esto se puede lograr poniendo en contacto la muestra biológica con restos de unión adicionales

específicos para las dianas, marcando los restos de unión con diferentes enzimas, poniendo en contacto la muestra con compuestos precursores de detección seleccionados para las enzimas y detectando los compuestos de detección.

5 También se divulga un kit que comprende un compuesto de amplificación de tinción divulgado en el presente documento. En algunos modos de realización, el kit comprende un conjugado enzima-anticuerpo, un QMP, una mezcla de disolventes y una solución de ajuste de pH. La mezcla de disolventes puede comprender un disolvente orgánico y un tampón acuoso. En algunos modos de realización, el disolvente orgánico es DMSO. El tampón acuoso puede tener un intervalo de pH de desde pH 0 a pH 5 o de pH 1 a pH 3. En algunos modos de realización, la solución de ajuste de pH tiene un intervalo de pH de desde pH 8 a pH 12. En modos de realización particulares, el kit incluye una sal, tal como cloruro de magnesio, que puede tener una concentración de desde 0,25 M a 1,5 M. En algunos modos de realización, el QMP es un compuesto divulgado en el presente documento, la mezcla de disolventes comprende DMSO y un tampón glicina a pH 2, la solución de ajuste de pH es un tampón Tris con un intervalo de pH de desde pH 8 a pH 10, y/o el kit comprende comprendiendo además cloruro de magnesio a una concentración de desde 0,5 M a 1,25 M.

Los anteriores y otros objetivos, rasgos y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que ilustra la detección de una diana usando un QMP que comprende un marcador detectable.

25 Las FIGS. 2(A) - 2(B) son tablas que proporcionan QMP ejemplares.

Las FIGS. 3(A) - 3(C) ilustran la conversión mediada por fosfatasa de un QMP con marcador detectable en una quinona metida que amplifica una señal de diana.

30 La FIG. 4 ilustra un modo de realización ejemplar de un procedimiento para amplificar la detección de la diana en un tejido biológico.

La FIG. 5 ilustra un segundo modo de realización ejemplar de un procedimiento para amplificar la detección de la diana en un tejido biológico.

35 Las FIGS. 6(A) - 6(C) son microfotografías que ilustran el incremento en la intensidad de tinción de derivados de QMP-dabsilo con conectores PEG, para Bcl-6 en tejido de amígdala a un aumento de 20x.

40 Las FIGS. 7(A) - 7(C) son microfotografías que ilustran el incremento en la intensidad de tinción de derivados de QMP-TAMRA con conectores PEG, para Bcl-6 en tejido de amígdala a un aumento de 20x.

La FIG. 8(A) es una microfotografía de un ensayo IHQ de campo claro doble de tejido de mama a un aumento de 10x, que ilustra la incubación de anticuerpo simultánea y detección cromogénica secuencial de Pan-Keratin (QM-PEG8-dabsilo, amarillo) y Her2 (Tyr-TAMRA, morado).

45 La FIG. 8(B) es una porción de la FIG. 8(A) aumentada a un aumento de 40x.

La FIG. 9 es una microfotografía de un ensayo IHQ de campo claro cuádruple de tejido de amígdala a un aumento de 40x, que ilustra la detección secuencial de CD8 (Tyr-rodamina-110, granate), CD3 (QM-Cy5, azul), FoxP3 (Tyr-TAMRA, morado) y Pan-Keratin (QM-PEG8-dabsilo, amarillo).

50 La FIG. 10 es una microfotografía de un ensayo doble fluorescente que utiliza detecciones tanto de QMP basado en AP (Ki67, rojo oscuro, nuclear) como de TSA basada en HRP (Bcl2, verde claro, membrana) en tejido de amígdala FFPE.

55 La FIG. 11 es una microfotografía de tinción con quinona metida de E-cadherina en tejido de mama a pH 7,5.

La FIG. 12 es una microfotografía de tinción con quinona metida de E-cadherina en tejido de mama a pH 10.

60 Las FIGS. 13(A) - 13(B) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción funcional de Ki67 en tejido de amígdala FFPE por un QMP que tiene un grupo saliente monofluoro y un marcador detectable de 5-nitro-3-pirazolcarbamida (nitropirazol) (A) en comparación con DAB *ultraView* (B).

65 Las FIGS. 14(A) - 14(D) son microfotografías que ilustran la tinción funcional de CD-10 (A) o amplificación de CD-10 en tejido de amígdala FFPE (B), Bcl2 en tejido de amígdala FFPE (C) o Her3 en tejido de mama FFPE (D) por un QMP que tiene un grupo saliente monofluoro y un marcador detectable de 5-nitro-3-pirazolcarbamida (nitropirazol,

NP), seguido de un conjugado anticuerpo anti-NP/fosfatasa alcalina y tinción con Fast Red (B-D).

Las FIGS. 15(A) - 15(C) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción funcional de Bcl2 en tejido de amígdala FFPE por un QMP que tiene un grupo saliente monofluoro y un resto detectable de TAMRA (A), un resto detectable de AF700 (B), o un nitropirazol detectable seguido de un anticuerpo anti-nitropirazol marcado con punto cuántico (QD525) (C).

Las FIGS. 16(A) - 16(D) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción funcional de Ki67 en tejido de amígdala FFPE por un QMP que tiene un grupo saliente monofluoro y un resto detectable de dabsilo (A), un resto detectable de TAMRA (B), un resto detectable de Cy5 (C) o un resto detectable de rodamina 110 (D).

Las FIGS. 17(A) - 17(B) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción funcional del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en tejido cutáneo incluido en parafina fijado en formol (FFPE) por 3,3'-diaminobencidina (DAB) *ultraView* (A) en comparación con un QMP que tiene un grupo saliente difluoro y conjugado con un marcador detectable de biotina (B).

Las FIGS. 18(A) - 18(D) son microfotografías que ilustran IHQ CARD basada en AP (BCL6 en tejido de amígdala FFPE) usando un precursor de difluoro-QM biotinilado seguido de detección de DAB a concentraciones variables del precursor de QM.

Las FIGS. 19(A) - 19(H) son microfotografías de IHQ CARD basada en AP (BCL6 en tejido de amígdala FFPE) usando precursor de difluoro-QM biotinilado 20  $\mu$ M seguido de detección de DAB que ilustra los resultados de tinción con pH variable.

Las FIGS. 20(A) - 20(H) son microfotografías de IHQ CARD basada en AP (BCL6 en tejido de amígdala FFPE) usando precursor de monofluoro-QMP biotinilado 250 nM seguido de detección de DAB que ilustra los resultados de tinción con pH variable.

Las FIGS. 21(A) - 21(D) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción óptima de Ki67 en tejido de amígdala FFPE por control *ultraView* (A) en comparación con un QMP que tiene un grupo saliente piridina (B), DABCO (C) o trietilamina (D) y conjugado con un marcador detectable de biotina.

Las FIGS. 22(A) - 22(D) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción funcional óptima de Ki67 en tejido de amígdala FFPE por DAB *ultraView* (A) y un QMP que tiene un grupo saliente monofluoro con un marcador detectable de biotina (B), en comparación con un QMP que tiene un grupo saliente acetato (C), o un grupo saliente metoxi (D), y un marcador detectable de biotina.

Las FIGS. 23(A) - 23(C) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción funcional de Bcl2 en tejido de amígdala FFPE por un QMP que tiene un grupo saliente monofluoro, un marcador detectable de biotina, y un conector anilina-amida (compuesto 7) (A), un conector benzoico-amida (compuesto 21) (B), o un conector tiramida-amida (compuesto 14) (C), de los que sus estructuras se proporcionan por la FIG. 2.

Las FIGS. 24(A) - 24(B) son aumentos adicionales de las microfotografías en la FIG. 17(B).

Las FIGS. 25(A) - 25(B) son aumentos adicionales de las microfotografías en la FIG. 17(A).

La FIG. 26 ilustra el atrapamiento del intermedio de QM de un precursor de QM monofluorado con Tris.

Las FIGS. 27(A) - 27(C) son cromatogramas de HPLC de los compuestos de la reacción ilustrada en la FIG. 24.

Las FIGS. 28(A) - 28(D) proporcionan estructuras ejemplares de los QMP divulgados en el presente documento.

Las FIGS. 29(A) - 29(B) son microfotografías que ilustran la mejora en la calidad de tinción de CD8 en tejido de amígdala con concentración de cloruro de magnesio creciente.

Las FIGS. 30(A) - 30(C) son microfotografías que ilustran la tinción funcional de Ki-67 en tejido de amígdala a un aumento de 20x con enzima  $\beta$ -galactosidasa y con  $\beta$ -galactósido-QMP-Cy5 (125  $\mu$ M) y Nuclear Fast Red CS (A),  $\beta$ -galactósido-QMP-Cy5 (125  $\mu$ M) y hematoxilina CS (B), y  $\beta$ -galactósido-QMP-Cy3 (100  $\mu$ M) y hematoxilina CS (C).

La FIG. 31 es una microfotografía de un ensayo IHQ de campo claro doble, que ilustra la detección simultánea de Bcl-6 (fosfo-QM-PEG8-dabsilo, amarillo) y Ki67 ( $\beta$ -Gal-QM-Cy5, azul) en tejido de amígdala con una contratinción de hematoxilina, usando incubación de anticuerpo simultánea y detección cromogénica simultánea.

Las FIGS. 32(A) - 32(B) son microfotografías de un ensayo IHQ de campo claro triple, que ilustra la detección simultánea de Her2, ER, PR en tejido de mama con fosfo-QM-PEG8-dabsilo,  $\beta$ -Gal-QM-Cy5, Tyr-TAMRA, con una contratinción de hematoxilina, usando incubación de anticuerpo simultánea y detección cromogénica simultánea.

La FIG. 33 es una microfotografía de un ensayo IHQ de campo claro cuádruple, que ilustra la detección secuencial de Her2 (DAB HRP, marrón), PR ( $\beta$ -Gal-QM-Cy5, azul), ER (Tyr-TAMRA, morado) y Ki67 (fosfo-QM-PEG8-dabsilo, amarillo) en tejido de mama.

La FIG. 34 es una segunda microfotografía de un ensayo IHQ de campo claro cuádruple, que ilustra la detección secuencial de Her2 (DAB HRP, marrón), PR ( $\beta$ -Gal-QM-Cy5, azul), ER (Tyr-TAMRA, morado) y Ki67 (fosfo-QM-PEG8-dabsilo, amarillo) en tejido de mama.

Las FIGS. 35(A) - 35(B) son microfotografías de IHQ del centrómero del cromosoma 17 en tejido de amígdala (A) y xenoinjertos de MCF-7 (B) con QM-Green (PEG8-dabsilo y Cy5).

Las FIGS. 36(A) - 36(D) son microfotografías de cuatro protocolos de tinción diferentes que muestran los mismos biomarcadores (Her2, Ki-67, ER y PR) en tejido de mama FFPE a un aumento de 40x, teñidos por detección secuencial usando dos detecciones basadas en HRP y dos sistemas de detección basados en QMP AP.

Las FIGS. 37(A) - 37(D) son microfotografías de protocolos de tinción diferentes (A-B o C-D) de CD3, CD8, CD20 (o CD68) y FoxP3 a un aumento de 5x en tejido de amígdala FFPE, teñidos por detección secuencial usando dos detecciones basadas en HRP y dos sistemas de detección basados en QMP AP.

Las FIGS. 38(A) - 38(B) son microfotografías que ilustran la amplificación de tinción funcional de E-cadherina en tejido de mama FFPE por un *orto*- y *para*-QMP-TAMRA a un aumento de 10x.

## Descripción detallada

### I. Definiciones

A menos que se indique de otro modo, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias similares.

Como se usa en el presente documento, los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Además, como se usa en el presente documento, el término "comprende" quiere decir "incluye". Por tanto, "que comprende A o B" quiere decir que incluye A, B o A y B. Se debe entender además que todos los tamaños de nucleótidos o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos u otros compuestos son aproximados y se proporcionan para su descripción. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en las pruebas de la presente divulgación, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

A menos que se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, porcentajes, temperaturas, tiempos, concentraciones, etc., como se usan en la memoria descriptiva o las reivindicaciones se deben entender como modificados por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique de otro modo, de forma implícita o explícita, los parámetros numéricos expuestos son aproximaciones que pueden depender de las propiedades deseadas buscadas y/o límites de detección en condiciones/procedimientos de prueba estándar. Cuando de forma directa y explícita se distinguen modos de realización de la técnica anterior analizada, los números de los modos de realización no son aproximados a menos que se enumere la palabra "aproximadamente".

Para las fórmulas generales proporcionadas a continuación, si no se indica ningún sustituyente, un experto en la técnica apreciará que el sustituyente es hidrógeno. Un enlace que no se conecta a un átomo, sino que se muestra, por ejemplo, extendiéndose al interior de un sistema de anillo, indica que la posición de dicho sustituyente es variable. Una línea curva a través de un enlace indica que alguna estructura adicional se une a esa posición. Además, si no se indica ninguna estereoquímica para los compuestos que tienen uno o más centros quirales, se incluyen todos los enantiómeros y diastereómeros. De forma similar, para una enumeración de grupos alifáticos o alquilo, se incluyen todos los isómeros estructurales de los mismos.

Para facilitar la revisión de los diversos modos de realización de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

**Alifático:** un compuesto sustancialmente basado en hidrocarburos, o un radical del mismo (por ejemplo, C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, para un radical hexano), incluyendo alcanos, alquenos, alquinos, incluyendo versiones cíclicas de los mismos, e incluyendo además disposiciones de cadena lineal y ramificada, y todos los estereoisómeros e isómeros de posición además. A menos que se establezca expresamente de otro modo, un grupo alifático contiene de uno a veinticinco átomos de carbono; por ejemplo, de uno a quince, de uno a diez, de uno a seis, o de uno a cuatro átomos de carbono. El término "alifático inferior" se refiere a un grupo alifático que contiene 1-10 átomos de carbono. A menos que se denomine expresamente "alifático insustituido", un grupo alifático puede ser insustituido o sustituido.

**Alquilo:** un grupo hidrocarburo que tiene una cadena de carbono saturada. La cadena puede ser cíclica, ramificada o no ramificada. El término **alquilo inferior** quiere decir que la cadena incluye 1-10 átomos de carbono. A menos que se establezca de otro modo, un grupo alquilo puede estar sustituido o insustituido.

**Alcoxi:** un grupo que tiene una fórmula -O-alquilo, donde alquilo es como se define en el presente documento.

**Análogo:** un análogo es una molécula que difiere en la estructura química de un compuesto original, por ejemplo, un homólogo (que difiere en un incremento en la estructura química, tal como una diferencia en la longitud de una cadena de alquilo), un fragmento molecular, una estructura que difiere en uno o más grupos funcionales, un cambio en la ionización. A menudo se encuentran análogos estructurales que usan relaciones cuantitativas de estructura-actividad (QSAR), con técnicas tales como las divulgadas en Remington (*The Science and Practice of Pharmacology*, 19ª edición (1995), capítulo 28).

**Aromático o arilo:** un grupo heterocíclico o carbocíclico aromático de, a menos que se especifique de otro modo, desde 6 a 15 átomos de anillo que tiene un anillo individual (por ejemplo, fenilo, piridilo) o múltiples anillos condensados en los que al menos un anillo es aromático (por ejemplo, quinolina, indol, benzodioxola, y similares), siempre que el punto de unión sea a través de un átomo de una porción aromática del grupo arilo. Si cualquier porción de anillo aromático contiene un heteroátomo, el grupo es un heteroarilo, de otro modo el grupo es un grupo arilo carbocíclico. Los grupos arilo pueden ser monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico. A menos que se establezca de otro modo, un grupo arilo puede estar sustituido o insustituido.

**Ariloxi:** un grupo que tiene una fórmula -O-arilo, donde arilo es como se define en el presente documento.

**Conjugado:** dos o más restos directa o indirectamente acoplados conjuntamente. Por ejemplo, un primer resto se pueden acoplar covalente o no covalentemente (por ejemplo, electrostáticamente) a un segundo resto. La unión indirecta es posible, tal como usando un "conector" (una molécula o grupo de átomos posicionado entre dos restos).

**Sistema conjugado:** como se usa en el presente documento, el término "sistema conjugado" se refiere a un compuesto que incluye orbitales solapantes (típicamente orbitales p) con electrones pi deslocalizados. Típicamente el compuesto incluye enlaces sencillos y múltiples alternantes. Los orbitales p solapantes forman puentes de enlaces sencillos entre orbitales p solapantes adyacentes. Pares solitarios, radicales e iones carbenio pueden ser parte del sistema. El sistema puede ser cíclico, acíclico o una combinación de los mismos. Los sistemas conjugados ejemplares incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos tales como benceno, pirazol, imidazol, piridina, pirimidina, pirrol, furano, tiofeno, naftaleno, antraceno, indol, benzoxazol, bencimidazol y purina.

**Puesta en contacto:** disposición que permite la asociación entre dos o más restos, en particular la asociación física directa, por ejemplo, tanto en forma sólida como en forma líquida (por ejemplo, la disposición de una muestra biológica, tal como una muestra biológica fijada a un portaobjetos, en contacto con una composición, tal como una solución que contiene las composiciones divulgadas en el presente documento).

**Detectar:** determinar si un agente (tal como una señal o antígeno, proteína o ácido nucleico particular) está presente o ausente, por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto puede incluir además cuantificación y/o localización, por ejemplo localización dentro de una célula o compartimento celular particular. "Detección" se refiere a cualquier procedimiento de determinación de si algo existe o no existe, tal como la determinación de si una molécula diana está presente en una muestra biológica. Por ejemplo, "detección" puede incluir el uso de un dispositivo visual o mecánico para determinar si una muestra presenta una característica específica. En determinados ejemplos, se usan microscopía óptica y otros medios microscópicos para detectar un marcador detectable unido a o de forma proximal a una diana.

**Marcador detectable:** una molécula o material que puede producir una señal detectable (tal como de forma visual, electrónica o de otro modo) que indica la presencia y/o concentración de una diana, tal como una molécula diana, en una muestra, tal como una muestra de tejido. Cuando se conjuga con una molécula que puede unirse directamente o de forma proximal a una diana, se puede usar el marcador detectable para localizar y/o cuantificar la diana. De este modo, se puede detectar la presencia y/o concentración de la diana en una muestra detectando la señal producida por el marcador detectable. Un marcador detectable se puede detectar directa o indirectamente, y se pueden usar varios marcadores detectables diferentes conjugados a moléculas diferentes en combinación para detectar una o más dianas. Se pueden conjugar múltiples marcadores detectables que se pueden detectar por separado a moléculas diferentes que se unen directamente o de forma proximal a diferentes dianas para

proporcionar un ensayo multiplexado que puede proporcionar la detección de las múltiples dianas en una muestra. Como se usa en el presente documento, los marcadores detectables incluyen moléculas coloreadas, fluorescentes, fosforescentes y luminiscentes, y haptenos.

5 **Grupo donador de electrones:** un átomo o grupo funcional que puede donar parte de su densidad electrónica en un sistema conjugado. La densidad electrónica se puede donar a través de enlaces  $\sigma$  (inductivo) o a través de enlaces  $\pi$  (resonancia). Algunos grupos funcionales son grupos donadores por un mecanismo y los grupos aceptadores a través del otro mecanismo. Los grupos donadores de electrones ejemplares incluyen, pero no se limitan a,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}$ ,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{R}$ , donde R es alquilo, tal como alquilo inferior (por ejemplo, metilo, etilo).

15 **Grupo aceptador de electrones:** un átomo o grupo funcional que puede aceptar densidad electrónica de un sistema conjugado. La densidad electrónica se puede aceptar a través de enlaces  $\sigma$  (inductivo) o a través de enlaces  $\pi$  (resonancia). Algunos grupos funcionales son grupos donadores por un mecanismo y los grupos aceptadores a través del otro mecanismo. Los grupos aceptadores de electrones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, halo, haloalquilo,  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{H}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ ,  $-\text{NR}_3^+$ , donde R es alquilo, tal como alquilo inferior (por ejemplo, metilo, etilo).

20 **Heteroalifático:** un compuesto alifático donde uno o más carbonos se han reemplazado por un heteroátomo. Los heteroátomos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, O, S, N, P, Si o B. Los restos heteroalifáticos pueden ser sustituidos o insustituidos. La sustitución puede ser en un átomo de carbono o en un heteroátomo.

25 **Heteroarilo:** un compuesto o grupo aromático que tiene al menos un heteroátomo, es decir, uno o más átomos de carbono en el anillo se han reemplazado por un átomo que tiene al menos un par solitario de electrones, típicamente nitrógeno, oxígeno, fósforo, silicio o azufre. A menos que se establezca de otro modo, un grupo heteroarilo puede estar sustituido o insustituido.

30 **Éster inorgánico:** un éster derivado de un ácido inorgánico y un alcohol. Los ácidos inorgánicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido bórico. Los ésteres inorgánicos incluyen, pero no se limitan a, sulfatos, fosfatos, nitratos o boratos, por ejemplo, trifenilfosfato.

35 **Grupo saliente:** un fragmento molecular que se elimina con un par de electrones durante la escisión de enlace heterolítica. Otro término para grupo saliente es nucleófugo. Los grupos salientes pueden ser aniones o moléculas neutras (si un grupo saliente está positivamente cargado mientras se une a la molécula, se volverá neutro cuando se vaya con un par de electrones). La capacidad de un fragmento molecular para ser un grupo saliente (es decir, su nucleofugacidad) se correlaciona con su estabilidad. En algunas circunstancias, por ejemplo, cuando el grupo saliente es una base débil, la capacidad de un grupo saliente para salir puede estar relacionada con el  $\text{pK}_a$  del ácido conjugado del grupo saliente, con  $\text{pK}_a$  menor a menudo pero que no siempre se correlaciona con una mejor capacidad del grupo saliente. Un experto en la técnica tiene conocimiento de tablas fácilmente disponibles, por ejemplo, en libros de texto de química orgánica, que indican la nucleofugacidad relativa de los grupos salientes.

45 **Sustancialmente no inhibidor:** un QMP es sustancialmente no inhibidor si forma una quinona metida que se difunde de la enzima para no reaccionar con el sitio reactivo de la enzima. Se puede establecer el sustancialmente no inhibidor sometiendo a prueba funcionalmente una enzima y QMP particulares. En general, si se incrementa la tinción, como se describe en el presente documento, durante periodos de tiempo prolongados (por ejemplo, >5 minutos), el QMP es sustancialmente no inhibidor. Si un QMP inhibe la enzima, la cantidad de tinción no se incrementará con el tiempo o con la adición de más QMP.

50 **Nucleófilo:** una especie química que puede donar un par de electrones a un átomo positivamente cargado (o parcialmente positivo) para formar un enlace químico durante una reacción química. Los aniones y moléculas con un par solitario de electrones o al menos un enlace pi pueden actuar como nucleófilos.

55 **Oligonucleótido:** una pluralidad de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 300 nucleótidos de longitud. Como se usa en el presente documento, el término oligonucleótido se refiere a oligonucleótidos de ADN, oligonucleótidos de ARN, oligonucleótidos sintéticos (por ejemplo, secuencias de ADN o ARN no naturales) y análogos oligonucleotídicos. Un análogo oligonucleotídico se refiere a restos que funcionan de forma similar a los oligonucleótidos pero que tienen porciones no naturales. Por ejemplo, los análogos oligonucleotídicos pueden contener porciones no naturales, tales como restos glucídicos alterados o uniones interglucídicas, tales como un oligodesoxinucleótido fosforotioato. Los análogos funcionales de polinucleótidos naturales se pueden unir a ARN o ADN, e incluyen moléculas de ácido peptidonucleico.

65 **Sonda:** una sustancia usada para detectar o identificar otra sustancia en una muestra. Como se usa en el presente documento, una sonda puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ácido nucleico aislado o un oligonucleótido sintético aislado que se puede unir específicamente a una diana deseada, por ejemplo, una proteína o secuencia de ácido nucleico diana presente en una muestra de tejido. La sonda puede comprender un marcador detectable o molécula indicadora (por ejemplo, un hapteno).

**Sustituido:** un compuesto fundamental, tal como un compuesto arilo o alifático, o un radical del mismo, que tiene acoplado al mismo, típicamente en lugar de un átomo de hidrógeno, otro átomo o grupo, es decir, un sustituyente. Por ejemplo, los compuestos de arilo sustituidos o los sustituyentes pueden tener un grupo alifático acoplado al anillo cerrado de la base de arilo, tal como con tolueno. De nuevo, solo a modo de ejemplo y sin limitación, un hidrocarburo de cadena larga puede tener un sustituyente unido al mismo, tal como uno o más halógenos, oxígeno tal como un hidroxilo o =O, un grupo arilo, un grupo cíclico, un grupo heteroarilo o un grupo heterocíclico.

**Diana:** una molécula para la que se va a determinar la presencia, locación y/o concentración. Las dianas ejemplares incluyen proteínas y secuencias de ácido nucleico presentes en muestras de tejido.

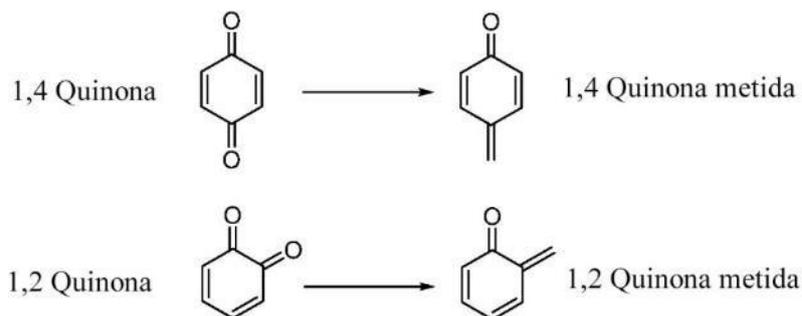
**Tiolato:** un resto que tiene una fórmula –S–R, donde R es un resto arilo, alifático o heteroalifático.

## II. Precursores de análogos de quinona metidas

### A. Visión general

La presente divulgación se refiere a composiciones, kits y procedimientos relacionados con QM y sus precursores. Los QMP de la presente divulgación se han desarrollado para la amplificación de acontecimientos de detección usando una conversión catalizada por enzimas de precursores de quinona metidas en quinona metidas reactivas, que se pueden unir directamente o de forma proximal a la enzima.

Las quinona metidas son análogos de quinona donde uno de los oxígenos del carbonilo en la quinona correspondiente se reemplaza por un grupo metileno (CH<sub>2</sub>) para formar un alqueno, como se muestra a continuación:



(Véase, por ejemplo, Rokita, *Quinone Methides*, abril 2009, John Wiley & Sons, Inc. para divulgación general relacionada con quinona metidas).

El resto metileno de una quinona metida es un electrófilo extremadamente reactivo que reaccionará con nucleófilos reactivos adecuados. Los nucleófilos reactivos se pueden proporcionar por una enzima reactiva de tinción, el anticuerpo al que se conjuga la enzima y la propia muestra biológica en aplicaciones inmunohistoquímicas. La generación de quinona metidas *in situ* permite que los marcadores se unan covalentemente a residuos nucleófilos dentro de una matriz (por ejemplo, tejido). Los reactivos nucleófilos ejemplares incluyen moléculas biológicas que comprenden grupos que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre reactivos, tales como grupos amino, hidroxilo y tiol de aminoácidos (por ejemplo, lisina, tirosina, treonina, serina y cisteína) y grupos amino, carbonilo e hidroxilo de ácidos nucleicos.

Inicialmente se investigaron sustratos enzimáticos que podían formar quinona metidas (QM) como inhibidores basados en mecanismo potenciales de enzimas hidrolasas. Por ejemplo, se investigaron QMP para inhibir la sulfatasa esteroidea (STS), que cataliza la desulfatación de esteroides sulfatados biológicamente inactivos en esteroides biológicamente activos. De acuerdo con este enfoque, la QM generada por STS reaccionaría con la STS para inhibir su actividad, por ejemplo, como enfoque terapéutico (Ahmed *et al. ChemBioChem.* **2009**;10:1457; para divulgación relacionada con el uso de QM para inhibir enzimas).

De acuerdo con otro enfoque, Lenger *et al.* divulgan la creación de perfiles de sulfatasas activas usando trampas de quinona metidas (QM) (es decir, sondas proteómicas basadas en actividad). Para crear perfiles de sulfatasas activas en estado sano y enfermedad, se evaluó una herramienta proteómica basada en actividad dirigida contra sulfatasas, la trampa de quinona metidas (QM), como sondas proteómicas basadas en actividad (ABPP). El concepto de trampa de QM aplicado por Lenger *et al.* implicó la generación *in situ* de un intermedio de QM reactiva que es dependiente del recambio enzimático en un inhibidor enzimático. Se usaron sustratos de fluorometilfenolatos sulfatos como precursor de QM para generar una QM que a continuación se fragmentaría espontáneamente por eliminación de fluoruro. Se usó la QM para capturar un residuo de sitio activo conservado en la sulfatasa, dando como resultado la

inactivación dependiente de recambio y el marcaje de proteína específico. Se diseñaron las trampas para tener reactividad de amplio espectro frente a sulfatasas (Lenger *et al. Bioorg Med Chem.* Ene 15, **2012**; 20(2): 622-627, para divulgación relacionada con el uso de trampas de QM para ABPP).

5 Los enfoques de Lenger *et al.* y Ahmed *et al.* son contrarios a la tecnología actualmente divulgada debido a que la inactivación enzimática no es un objetivo de los presentes modos de realización. En cambio, se debe evitar la inactivación enzimática cuando se está usando la enzima para amplificar la detección usando marcadores basados en QM. Cuando se usa para detección, es deseable mantener la actividad enzimática de modo que cada enzima pueda producir mayor señalización. En general, desactivar la enzima es contrario al objetivo de amplificación descrito en el presente documento. En otras palabras, el precursor de QM se selecciona y/o diseña para evitar la desactivación enzimática. En cambio, el precursor de QM se selecciona y/o diseña de modo que la QM se pueda difundir del sitio catalítico de la enzima. Aunque no inactiva la enzima, la QM debe ser lo suficientemente reactiva con los nucleófilos en la proximidad de la enzima como para proporcionar un marcaje diana apropiado.

15 Todavía en otro ejemplo, una divulgación por Qing Shao *et al.* describió el uso de un precursor de QM como indicador covalente de la actividad beta-lactamasa para la obtención de imágenes fluorescentes y el cribado rápido de bacterianas resistentes a antibióticos (Shao, Q.; Zheng, Y.; Dong, X. M.; Tang, K.; Yan, X. M.; Xing, B. G. *Chem-Eur J* **2013**, 19, 10903; para divulgación relacionada con el uso de marcadores de QM para marcar de forma fluorescente células bacterianas completas). De acuerdo con este enfoque, la QM se usa como sonda fluorescente que se puede activar por la beta-lactamasa asociada con resistencia, que es una enzima bacteriana natural que destruye los antibióticos penicilina y cefalosporina. La sonda de QM divulgada requiere la escisión del grupo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) de extinción de la fluorescencia, junto con la formación de una quinona metida reactiva, que a continuación se puede unir a las bacterias resistentes a antibióticos. Este enfoque se basa en enzimas endógenas activas y busca marcar inespecíficamente todas las bacterias resistentes a antibióticos. Además, las células bacterianas se tiñeron en solución. Esta tinción en solución es ventajosa porque la concentración de células en solución dicta la distancia intercelular y se puede usar la dilución para incrementar las distancias intercelulares.

La presente divulgación usa enzimas no endógenas para evitar crear falsos negativos en un protocolo de tinción. Los QMP divulgados en el presente documento se diseñaron para unirse de forma proximal a la enzima sin inhibir la enzima (es decir, los QMP son sustancialmente no inhibidores de la enzima). Aunque la difusión de largo alcance del compuesto de QM reactiva no fue pertinente de acuerdo con el enfoque de Qing Shao *et al.*, el precursor de QM de la presente divulgación se selecciona y/o diseña para que sea suficientemente reactivo para limitar las distancias de difusión de la diana. Por ejemplo, cuando se usa en una muestra de tejido incluido en parafina fijado en formol (FFPE), la difusión de largo alcance de las especies reactivas daría como resultado una tinción difusa y borrosa. En consecuencia, los compuestos de QM reactiva demasiado estables serían inadecuados para su uso en la tinción de tejidos. Los ejemplos incluidos en el presente documento demuestran este resultado de tinción desfavorable cuando se usan compuestos reactivos con compuestos de QM demasiado estables.

40 Un publicación reciente de Kwan *et al.* (*Angew Chem Int Edit* **2011**, 50, 300, para la divulgación relacionada con el uso de marcadores de QM para marcaje de forma fluorescente) informó de la tinción histológica vegetal fluorescente utilizando glucósidos de cumarina modificados para generar QM tras la reacción con su glucosidasa análoga. Este informe demostró el potencial de las QM para el marcaje covalente de proteínas en fase sólida, y es un rasgo importante de la tecnología de TSA actual. Una limitación clave de la sonda descrita por Kwan *et al.* es el requisito de que cada molécula indicadora se modifique sintéticamente para que contenga funcionalidad de precursor de QM. Esto es, en el marcaje de enzimas de interés en células vegetales, se modificó la cumarina para que sea tanto la especie generadora de quinona metida como el marcador. Este enfoque añade coste y complejidad significativos a la generación de diversos marcadores y sería inadecuado para muchos marcadores detectables (por ejemplo, los marcadores detectables que tienen una estructura que no se puede modificar para incluir un resto generador de quinona metida). Como tal, Kwan *et al.* no describen una molécula detectable de QM con un resto generador de quinona metida separado y un resto detectable. Kwan *et al.* también establecen que los precursores de QM desarrollados previamente se han implementado de forma ineficaz. En consecuencia, todavía persiste la necesidad en la técnica de obtener compuestos precursores de QM que comprendan un resto generador de QM separado y un resto detectable, y den como resultado una QM que no inhiba la enzima. En particular, Kwan *et al.* concluye que el tiempo requerido para que el (di)halometilfenol se descomponga, y para que la quinona metida generada de este modo reaccione, a menudo es suficientemente largo como para que el reactivo se pueda difundir del sitio activo y reaccionar con otros nucleófilos disponibles, incluyendo agua. Además, Kwan *et al.* divulga compuestos precursores de QM que comprenden un resto difluorometilo y describen su superioridad sobre el derivado monofluorometilo basada en la mayor estabilidad del compuesto precursor de difluorometilo-QM hacia la solvolisis y en la mayor estabilidad del compuesto de fluoro-QM generado del compuesto precursor.

Los precursores de quinona actualmente descritos y los procedimientos de uso de los mismos usan un enfoque generalizado en el que el marcador detectable y las funciones de generación de quinona metida y estabilización nucleófila se separan dentro de una molécula. Un enfoque es el uso de un andamiaje de precursor de QM individual que contiene un grupo conector funcionalizado con amina que permite la conjugación simple casi a cualquier

molécula detectable. Un modo de realización importante se refiere a aplicar CARD a inmunoensayos en fase sólida, tales como IHQ en tejido FFPE. En consecuencia, el uso de un grupo fosfato para ejemplificar el grupo de reconocimiento escindible de enzima fue una elección lógica debido a la ubicuidad de su enzima análoga fosfatasa alcalina (AP) en inmunoensayos actuales.

En referencia ahora a la FIG. 1, la aplicación de CARD basada en AP para IHQ comienza con la incubación de un anticuerpo primario (Ab) 102 con una muestra. Ab 102 reconoce un antígeno 104 de interés. A continuación se incubaba la muestra con un Ab secundario 106 que se une al Ab primario por unión de Ab anti-especie típica. Se marca el anticuerpo secundario 106 con una enzima 108, por ejemplo fosfatasa alcalina (AP). A continuación se aplica el precursor de QM marcado detectable 110. El precursor de QM marcado detectable 110 incluye un grupo indicador 112 y un grupo de reconocimiento de enzima 114 (un fosfato en este ejemplo). La AP reconoce y escinde el grupo fosfato, dando como resultado la expulsión del grupo saliente y la formación de una QM. Estas QM reaccionan con nucleófilos de tejido inmovilizado en estrecha proximidad con el sitio de generación, o bien se desactivan por nucleófilos en el medio de reacción. Las moléculas detectables que se unen covalentemente al tejido se detectan a continuación por una de una variedad de técnicas en el caso de haptenos, o por microscopía de fluorescencia en el caso de fluoróforos.

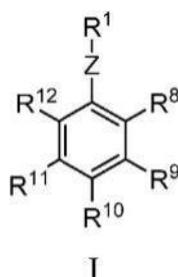
### B. Compuestos

Como se divulga en el presente documento, un QMP comprende un sistema conjugado que incluye un grupo de reconocimiento de enzima, un grupo saliente, un marcador detectable unido al sistema a través de un conector, que se puede ser un enlace o puede ser un resto conector. El sistema conjugado puede ser un sistema aromático. El sistema se conjuga de modo que cuando el grupo de reconocimiento de enzima interactúa con la enzima correspondiente, y el grupo saliente sale, da como resultado una QM.

El grupo de reconocimiento de enzima se selecciona en base a su idoneidad para la interacción con una enzima particular. Por ejemplo, para la interacción adecuada con una fosfatasa, el grupo de reconocimiento de enzima es un fosfato ( $-P(O)(OH)_2$ ), típicamente unido a través de un oxígeno, nitrógeno o azufre al sistema conjugado; para una fosfodiesterasa, el grupo de reconocimiento de enzima es un fosfodiesté; para una esterasa, es un éster; para una amidasa o una proteasa, es una amida; para una nitroreductasa, es un grupo nitro; para una ureasa, es un grupo urea; para una sulfatasa, es un sulfato; para una enzima citocromo P450, es típicamente un alcoxi; para una lactamasa, el grupo de reconocimiento de enzima es un resto que contiene  $\beta$ -lactama; y para glucosidasas, galactosidasas y glucoronidasas, es un glúcido apropiado de enzima (por ejemplo, alfa o beta-glucosa, alfa o beta-galactosa, etc.) unido por un oxígeno al sistema conjugado.

El grupo saliente y el marcador detectable y conector pueden ser parte del mismo sustituyente del sistema conjugado, y en algunos modos de realización, se localizan adyacentes, u *orto*, al grupo de reconocimiento de enzima.

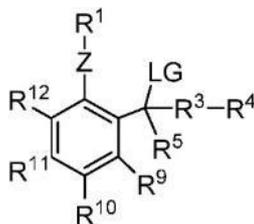
En modos de realización particulares, el QMP tiene una fórmula I



donde Z es O, S o  $NR^a$  y  $R^1$  es un fosfato, o  $ZR^1$  es un fosfato;  $R^8$  es  $-C(LG)(R^5)(R^3R^4)$ ;  $R^9$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$  son cada uno independientemente hidrógeno, halo, ciano, alifático, alcoxi,  $NO_2$ ,  $N(R^c)_2$ , arilo, haloalquilo,  $-C(O)$ alquilo,  $-C(S)$ alquilo,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)O$ alquilo,  $-C(O)NHR^c$ ,  $-C(O)N(R^c)_2$ ,  $-R^3R^4$  o dos grupos adyacentes conjuntamente forman un anillo alifático o anillo arilo;  $R^{10}$  es hidrógeno, halo, ciano, alifático, alcoxi,  $NO_2$ ,  $N(R^c)_2$ , arilo, haloalquilo,  $-C(O)$ alquilo,  $-C(S)$ alquilo,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)O$ alquilo,  $-C(O)NHR^c$ ,  $-C(O)N(R^c)_2$ ,  $-R^3R^4$ ,  $-C(LG)(R^5)(R^6)$  o con uno de  $R^9$  o  $R^{11}$  forman un anillo alifático o anillo arilo; cada  $R^a$  independientemente es hidrógeno o alifático, típicamente alquilo o alquilo inferior; LG es un grupo saliente;  $R^3$  es un enlace o un conector;  $R^4$  es un marcador detectable; cada  $R^c$  independientemente es hidrógeno, arilo, alifático o heteroalifático, o dos restos  $R^c$  conjuntamente forman un anillo heteroalifático; cada  $R^5$  es independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquilo inferior, haloalquilo inferior,  $-C(O)$ alquilo,  $-C(S)$ alquilo,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)O$ alquilo,  $-C(O)NHR^c$  o  $-C(O)N(R^c)_2$ ; cada  $R^6$  es independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquilo inferior, haloalquilo inferior,  $-C(O)O$ alquilo,  $-C(S)$ alquilo,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)O$ alquilo,  $-C(O)NHR^c$  o  $-C(O)N(R^c)_2$ ; y si LG es halo, entonces  $R^5$  y  $R^6$  no son halo. Además con referencia a la fórmula IV, al menos uno de  $R^8$  y  $R^{10}$  comprende LG, y el QMP comprende al menos un resto  $-R^3R^4$ . En algunos modos de realización, al menos uno de  $R^8$ - $R^{12}$  comprende o consiste en  $R^3R^4$ , y en determinados modos de realización, al

menos uno de R<sup>8</sup> y R<sup>10</sup> comprende o consiste en R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>.

Otro análogo ejemplar particular de fórmula I incluye



5

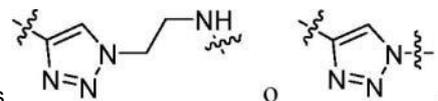
LG puede ser un haluro, alcoxi, carboxilato, éster inorgánico, tiolato, amina, carboxilato o fenóxido. En otros ejemplos, LG es fluoro, cloro, acido, metoxi, etoxi, isopropoxi, acetato, piridio, DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano) o trietilamina. En determinados modos de realización, LG es F, Cl, -OS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -OS(O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, -OS(O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -OS(O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CX<sub>3</sub>, -OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -N<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -N<sub>3</sub>, -NC<sub>5</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>, -O-alquilo -OC(O)alquilo, -OC(O)H, -N(R<sup>b</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup> o DABCO, donde X es F, Cl, Br o I, y cada R<sup>b</sup> independientemente es hidrógeno o alquilo inferior o dos restos R<sup>b</sup> conjuntamente forman un anillo heteroalifático.

10

En algunos modos de realización, R<sup>3</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-, -N(H)C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-, -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-, -O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-, -N(H)C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-, -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-, -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>S-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>S-, -N(H)C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>S-, -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>S-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-, -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, -C(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHC(O)CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH- o -N(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH-, donde cada n independientemente es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. En determinados modos de realización, R<sup>3</sup> es -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, -NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NH-, -NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-, -CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>-, -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, -CO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-, -CO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH- o -C(O)N(H)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NHC(O)CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH-.

15

20



R<sup>3</sup> puede comprender un triazol, y en algunos modos de realización, R<sup>3</sup> es En algunos modos de realización, -C(LG)R<sup>3</sup>- o -C(LG)R<sup>5</sup>- forma un anillo epóxido.

25

R<sup>4</sup> puede ser un hapteno, fluoróforo, luminóforo o cromógeno. En determinados ejemplos, -R<sup>4</sup> o conector-marcador detectable (-R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>) es biotina conjugada a la molécula por un conector alifático, nitropirazol (NP), NP con un conector PEG, tal como un conector PEG-8, TAMRA, DNP, Fast Red, HQ, HQ con un conector PEG, tal como un conector PEG-8, benzofurazano, Rhod 110, dabsilo con un conector PEG, tal como un conector PEG-8, o Cy.

30

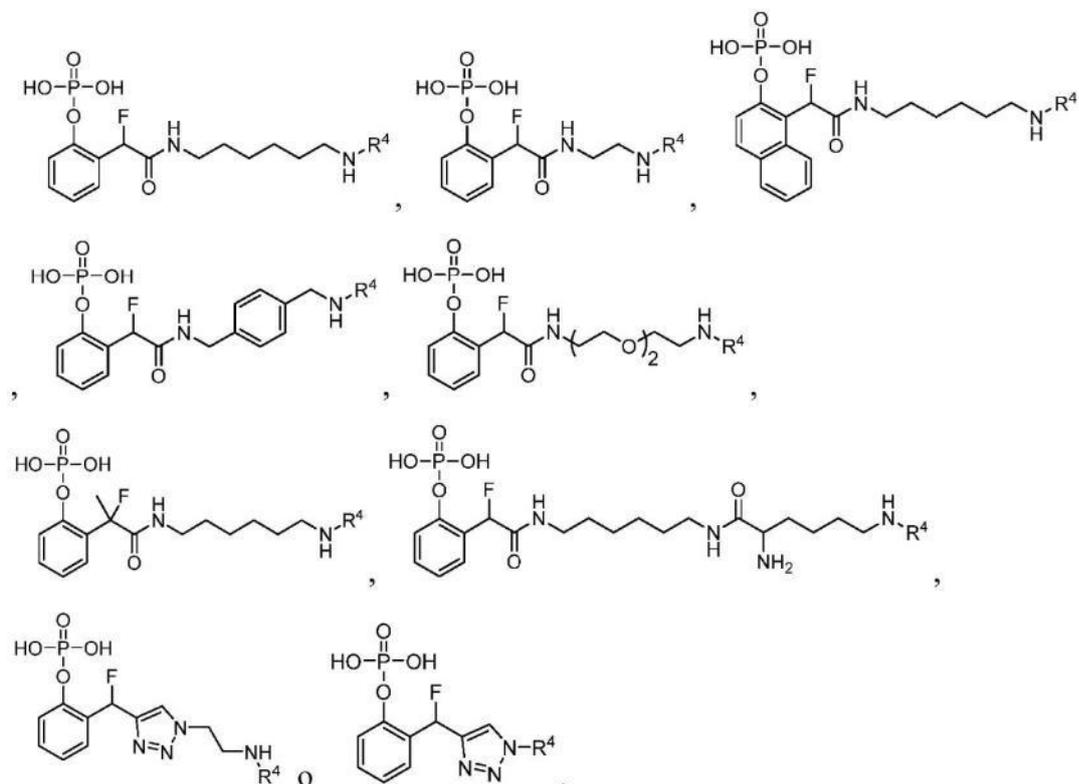
En algunos modos de realización, ZR<sup>1</sup> es -OP(O)(OH)<sub>2</sub>, -SP(O)(OH)<sub>2</sub>, -NR<sup>a</sup>P(O)(OH)<sub>2</sub>, -OC(=O)R<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>)C(=O)R<sup>a</sup>, -NO<sub>2</sub>, -NR<sup>a</sup>-C(=O)-N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, -OSO<sub>3</sub>H, -OR<sup>a</sup>, -O-resto que contiene β-lactama, -S-resto que contiene β-lactama o -O-glúcido donde el glúcido es un glúcido apropiado de enzima, tal como alfa o beta-glucosa, alfa o beta-galactosa, etc., o una sal del mismo. En otros modos de realización, ZR<sup>1</sup> y LG conjuntamente forman un fosfodiéster, -OP(O)(OH)O-.

35

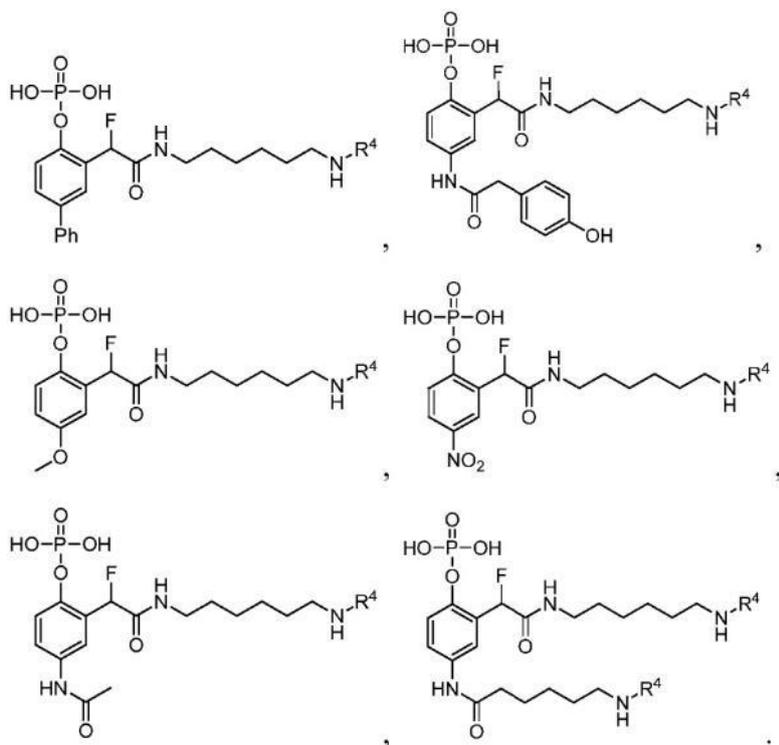
En determinados modos de realización, LG es F, y en modos de realización particulares, LG es F y R<sup>5</sup> o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son H.

Para determinados modos de realización ejemplares de fórmula I, el QMP se selecciona de

40



En otros modos de realización ejemplares de fórmula I, el QMP se selecciona de



5

En los ejemplos anteriores, R<sup>4</sup> es un marcador detectable, tal como un hapteno, fluoróforo, luminóforo o cromógeno. Un experto en la técnica apreciará que los restos ZR<sup>1</sup>, LG y R<sup>3</sup> mostrados en cada caso son restos ejemplares, y se pueden reemplazar por cualquier resto ZR<sup>1</sup>, LG y R<sup>3</sup> divulgado en el presente documento.

10

En algunos modos de realización ejemplares, el compuesto de acuerdo con la fórmula I comprende al menos un marcador detectable y un resto seleccionado de

- dihidrogenofosfato de 2-(2-((6-(amino)hexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- 5 dihidrogenofosfato de 2-(2-((2-aminoetil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 1-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)naftalen-2-ilo;
- dihidrogenofosfato de 2-(2-((4-(aminometil)bencil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- 10 ácido (2S,3S,4S,5R,6R)-6-(2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;
- N-(6-aminohexil)-2-fluoro-2-(2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)acetamida;
- 15 ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;
- N-(6-aminohexil)-2-fluoro-2-(2-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)acetamida;
- 20 N-(6-aminohexil)-2-fluoro-2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)acetamida;
- 25 ácido (6R,7R)-7-acetamido-3-((2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenoxi)metil)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxílico;
- ácido (6R,7R)-7-acetamido-3-(((2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenil)tio)metil)-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-eno-2-carboxílico;
- 30 hidrogenosulfato de 2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- N-(6-aminohexil)-2-fluoro-2-(2-metoxifenil)acetamida;
- 35 propionato de 2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 2-(2-((2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 2-(1-((6-aminohexil)amino)-2-fluoro-1-oxopropan-2-il)fenilo;
- 40 2-(2-acetamidofenil)-N-(6-aminohexil)-2-fluoroacetamida;
- N-(6-aminohexil)-2-fluoro-2-(2-nitrofenil)acetamida;
- 45 N-(6-aminohexil)-2-fluoro-2-(2-ureidofenil)acetamida;
- N-(6-aminohexil)-2-fluoro-2-(2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)fenil)acetamida;
- 50 dihidrogenofosfato de 2-(2-((6-(2,6-diaminohexanamido)hexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 2-((1-(2-aminoetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fluorometil)fenilo; o
- dihidrogenofosfato de 2-(fluoro(1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)fenilo.
- 55 En otros modos de realización, el resto se selecciona de
- dihidrogenofosfato de 3-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)-[1,1'-bifenil]-4-ilo;
- 60 dihidrogenofosfato de 2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)-4-(2-(4-hidroxifenil)acetamido)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)-4-metoxifenilo;
- dihidrogenofosfato de 2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)-4-nitrofenilo;
- 65 dihidrogenofosfato de 4-acetamido-2-(2-((6-aminohexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;

- dihidrogenofosfato de 4-(6-aminohexanamido)-2-(2-((6-aminohehexil)amino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- 5 dihidrogenofosfato de 4-(6-aminohexanamido)-2-(fluorometil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 4-((6-aminohehexil)carbamoil)-2-(fluorometil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 4-(2-aminoetil)-2-(fluorometil)fenilo;
- 10 dihidrogenofosfato de 4-(6-aminohexanamido)-2-(1-fluoroetil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 2-(6-aminohexanamido)-4-(1-fluoroetil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 4-(6-aminohexanamido)-2-(2-(etilamino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- 15 dihidrogenofosfato de 4-(6-aminohexanamido)-2-(2-(butilamino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- 6-amino-N-(2-hidroxi-2-oxido-4H-benzo[d][1,3,2]dioxafosfinin-6-il)hexanamida;
- 20 dihidrogenofosfato de 2-(6-aminohexanamido)-4-(2-(etilamino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 2-(6-aminohexanamido)-4-(2-(butilamino)-1-fluoro-2-oxoetil)fenilo; o
- 25 dihidrogenofosfato de 2-((6-aminohehexil)carbamoil)-4-(1-fluoroetil)fenilo;
- donde el marcador detectable es un hapteno, fluoróforo, luminóforo o cromógeno, y que el grupo de reconocimiento de enzima, grupo saliente y resto conector son ejemplares, y se pueden reemplazar por cualquier grupo de reconocimiento de enzima, grupo saliente y resto conector divulgados en el presente documento.
- 30 La FIG. 2(A) proporciona una tabla que ilustra algunos precursores de QM ejemplares adicionales.
- En algunos modos de realización, el compuesto se selecciona de
- 35 dihidrogenofosfato de 2-(fluorometil)-4-(6-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 4-(6-(2-((2,4-dinitrofenil)amino)acetamido)hexanamido)-2-(fluorometil)fenilo;
- 40 dihidrogenofosfato de 2-(fluorometil)-4-(1-(5-nitro-1H-pirazol-3-il)-1,29-dioxo-5,8,11,14,17,20,23,26-octaoxa-2,30-diazahehexatriacontan-36-amido)fenilo;
- dihidrogenofosfato de (E)-4-(6-(4-((3-(4-cloro-2-metilfenil)carbamoil)-2-hidroxi-naftalen-1-il)diazenil)benzamido)hexanamido)-2-(fluorometil)fenilo;
- 45 dihidrogenofosfato de 4-(6-(3',6'-bis(dimetilamino)-3-oxo-3H-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-5-carboxamido)hexanamido)-2-(fluorometil)fenilo;
- dihidrogenofosfato de 4-(6-(3',6'-diamino-3-oxo-3H-espiro[isobenzofuran-1,9'-xanteno]-5-carboxamido)hexanamido)-2-(fluorometil)fenilo;
- 50 cloruro de 1-(6-((6-((3-(fluorometil)-4-(fosfonooxi)fenil)amino)-6-oxohexil)amino)-6-oxohexil)-3,3-dimetil-2-((1E,3E)-5-((Z)-1,3,3-trimetilindolin-2-iliden)penta-1,3-dien-1-il)-3H-indol-1-io;
- 55 dihidrogenofosfato de 2-(metoximetil)-4-(6-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)fenilo;
- acetato de 5-(6-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)-2-(fosfonooxi)bencilo;
- 60 1-(5-(6-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)-2-(fosfonooxi)bencil)piridin-1-io;
- 1-(5-(6-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)-2-(fosfonooxi)bencil)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-io;
- 65 N,N-dietil-N-(5-(6-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)-2-(fosfonooxi)bencil)etanaminio;

dietilcarbamato de 5-(6-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)hexanamido)-2-(fosfonooxi)bencilo;

5 dihidrogenofosfato de 2-(fluorometil)-4-((5-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)pentil)carbamoil)fenilo; o

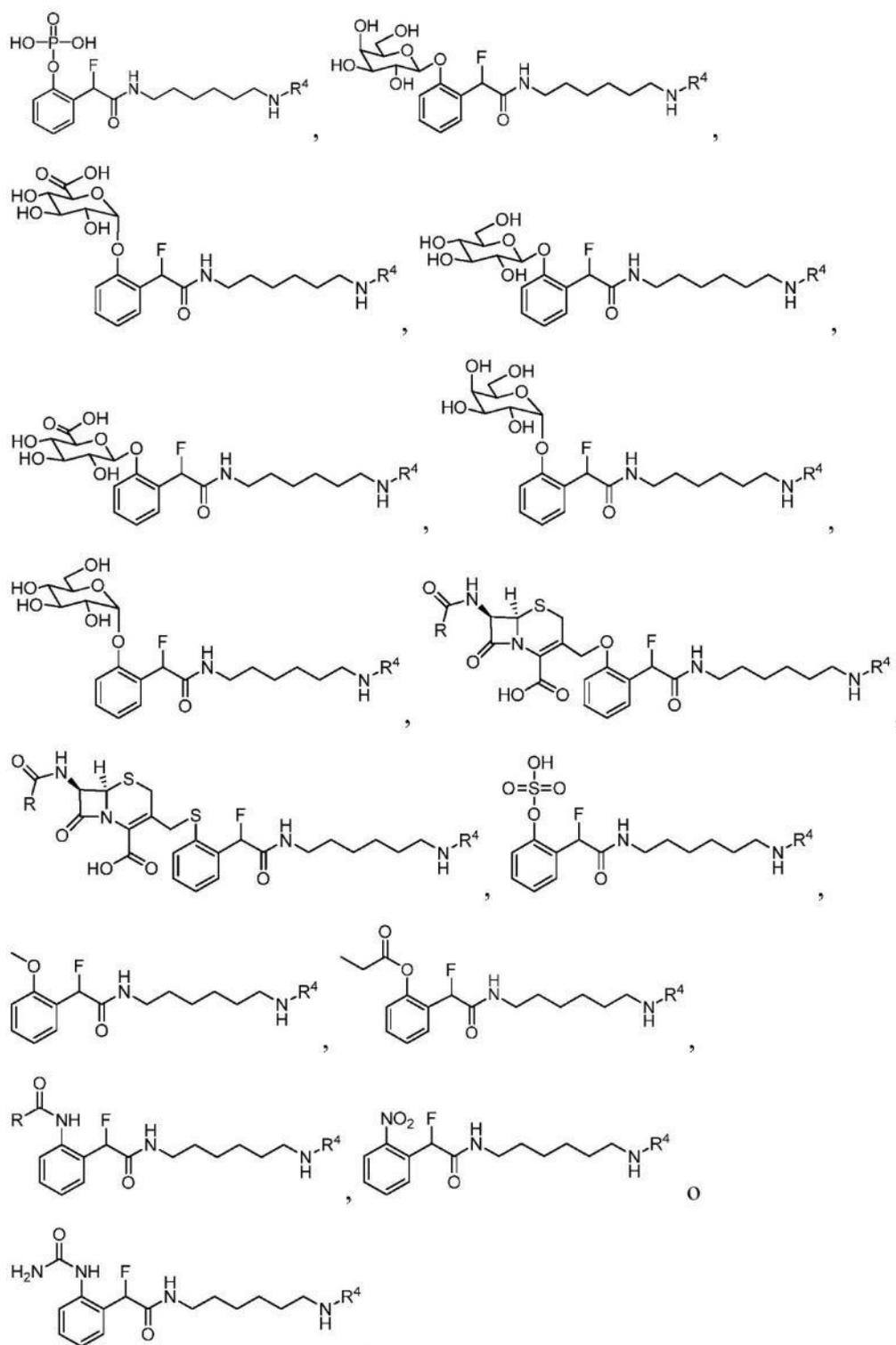
dihidrogenofosfato de 2-(fluorometil)-4-(2-(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)etil)fenilo.

10 En otros modos de realización de fórmula II, el anillo conjugado es un anillo heteroarilo o heterocíclico. Los anillos heteroarilo o heterocíclico ejemplares incluyen, pero no se limitan a, pirazol, imidazol, piridina, pirimidina, piridazina, pirazina, pirrol, furano, tiofeno, indol, benzoxazol, bencimidazol, tiazol, oxazol, imidazol o purina.

***i) Grupo de reconocimiento de enzima***

15 El grupo de reconocimiento de enzima se puede seleccionar de cualquier grupo que sea adecuado para el reconocimiento de enzima. En los ejemplos ilustrativos, el grupo de reconocimiento de enzima se selecciona de fosfato, fosfodiéster, amida, nitro, urea, sulfato, metilo, éster, alfa o beta-glucosa, beta-lactama, alfa o beta-galactosa, alfa o beta-lactosa y ácido alfa o beta-glucurónico. Un experto en la técnica puede seleccionar un grupo de reconocimiento de enzima apropiado en base a la enzima que se está usando, tal como, grupos adecuados para  
 20 el reconocimiento por una fosfatasa, fosfodiesterasa, esterasa, lipasa, amidasa, proteasa, nitroreductasa, ureasa, sulfatasa, citocromo P450, alfa o beta-glucosidasa, alfa o beta-lactamasa, alfa o beta-glucoronidasa, alfa o beta-galactosidasa, alfa o beta lactasa.

25 Los ejemplos proporcionados a continuación ilustran grupos de reconocimiento de enzima ejemplares para un QMP particular



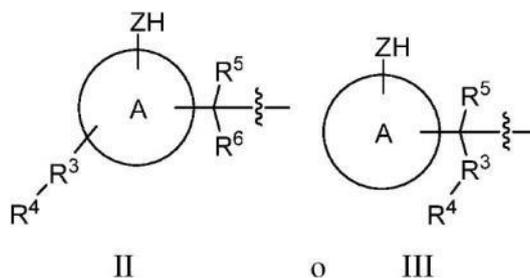
En referencia ahora a la FIG. 3(A) - (C), una muestra 200 que tiene una diana 202 se pone en contacto por un anticuerpo 204. Se muestra la diana 202 que se une específicamente por el anticuerpo 204. El anticuerpo 204 se conjuga a una o más enzimas 206. Cuando está en contacto con un QMP 208, la enzima 206 cataliza la escisión de un grupo de reconocimiento de enzima, ejemplificado por un grupo fosfato, de QMP 208 para producir un intermedio fenol 210. El fenol elimina el grupo saliente (LG) para producir un conjugado de QM 212. El conjugado de QM 212 es un electrófilo reactivo que puede reaccionar con nucleófilos.

En referencia ahora a la FIG. 3(B), el conjugado de QM 212 puede reaccionar con nucleófilos presentes en la muestra 200, tales como grupos amina o sulfhidrilo, como se ilustra. Se forma un complejo unido covalentemente 214 entre el conjugado de QM 212 y la muestra 200 cuando el conjugado de QM electrófilo y los grupos nucleófilos

en la muestra reaccionan. Puesto que la enzima 206 se localizó de forma proximal a la diana 202 a través del anticuerpo 204, el marcador detectable 216 se une covalentemente a la muestra 200 de forma proximal a la diana 202. Por tanto, se puede detectar el marcador detectable 216 para identificar la presencia de la diana 202. Esta reacción se produce reiteradamente de modo que se forman muchos complejos 214 en cada diana, amplificando de este modo la señal asociada con el acontecimiento de detección. El marcador detectable 216 puede ser cualquier compuesto útil por lo tanto, tal como un hapteno, fluoróforo, luminóforo o cromógeno que se pueda detectar por medios adecuados. La enzima 206 se puede unir directa o indirectamente a una diana 202.

En referencia ahora a la FIG. 3(C), un experto en la técnica entenderá que una reacción competitiva entre el conjugado de QM 212 y un disolvente (por ejemplo, agua) puede dar como resultado la formación de compuestos no unidos 218. Los compuestos no unidos 218 se pueden eliminar por lavado, reduciendo de este modo la tinción indiscriminada de la muestra en otras localizaciones.

En compuesto unido covalentemente 214 tiene una estructura general de acuerdo con las fórmulas II o III:



en las que A, Z y R<sup>3</sup>-R<sup>6</sup> son como se define previamente.

La fosfatasa alcalina (ALP, ALKP) (EC 3.1.3.1) es una enzima hidrolasa responsable de retirar los grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, incluyendo nucleótidos, proteínas y alcaloides. El procedimiento de retirar el grupo fosfato se denomina desfosforilación. Como el nombre sugiere, las fosfatasas alcalinas (también denominadas fosfatasas básicas) son más eficaces en un entorno alcalino. Las fosfatasas alcalinas tienen varios atributos que son ventajosos con relación a las enzimas disponibles incluyendo, por ejemplo: (1) la fosfatasa alcalina tiene un kcat/Km que se aproxima al límite controlado de difusión de  $1 \times 10^9$  litro/mol·s; (2) el pH óptimo de la fosfatasa alcalina es 9-10, un pH adecuado para la posterior reacción de la QM; (3) las fosfatasas alcalinas son enzimas muy estables que resisten la degradación térmica y química mejor que la mayoría de las enzimas; y (4) las fosfatasas alcalinas son razonablemente pequeñas y se han desarrollado procedimientos de conjugación a otras moléculas biológicas.

Las sulfatasas (EC 3.1.6) son enzimas esterasas que catalizan la hidrólisis de ésteres de sulfato en muchos tipos de moléculas incluyendo esteroides, carbohidratos y proteínas. Escinden hidrolíticamente ésteres de sulfato a través de un único aldehído catalítico, que se introduce por una oxidación postraducciona. Las sulfatasas se distribuyen en una amplia variedad de tejidos en todo el cuerpo.

Las glucosidasas, también conocidas como glucósido hidrolasas (EC 3.2.1), catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos en glúcidos complejos. Son enzimas sumamente comunes en la naturaleza y catalizan la hidrólisis de ambos O y S-glucósidos.

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de grasas. Son una subclase de enzimas esterasas, y se encuentran en una amplia variedad de organismos y tipos de tejidos.

Las  $\beta$ -lactamasas (EC 3.5.2.6) son enzimas que abren los anillos de  $\beta$ -lactama por un mecanismo de hidrólisis. Se producen por algunas bacterias y pueden dar como resultado la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, tales como penicilinas.

## ii) Grupo saliente

El grupo saliente puede ser cualquier grupo adecuado que puede actuar como grupo saliente para formar una quinona metida cuando el QMP se pone en contacto por una enzima adecuada. En algunos modos de realización, el grupo saliente es un grupo que puede salir como anión, con una carga negativa formal. En otros modos de realización, el grupo saliente tiene una carga positiva antes de salir del QMP, y sale como especie neutra. Los grupos salientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, haluro, ácido, éster de sulfato, carboxilato, éster inorgánico, tiolato, amina, arilo, alcoxi o heteroarilo. En modos de realización particulares, LG es fluoruro, cloruro, acetato, metoxi, etoxi, isopropoxi, fenóxido,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CX}_3$  donde X es halo,  $-\text{OC}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{N}_2^+$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NC}_5\text{H}_5^+$ ,  $-\text{O}$ -alquilo,  $-\text{OC}(\text{O})$ -alquilo,  $-\text{OC}(\text{O})\text{H}$ ,  $-\text{N}(\text{R}^b)_3^+$  donde cada R<sup>b</sup> independientemente es hidrógeno o alquilo inferior o dos restos R<sup>b</sup> conjuntamente forman un anillo heteroalifático, o DABCO.

**iii) Marcadores detectables**

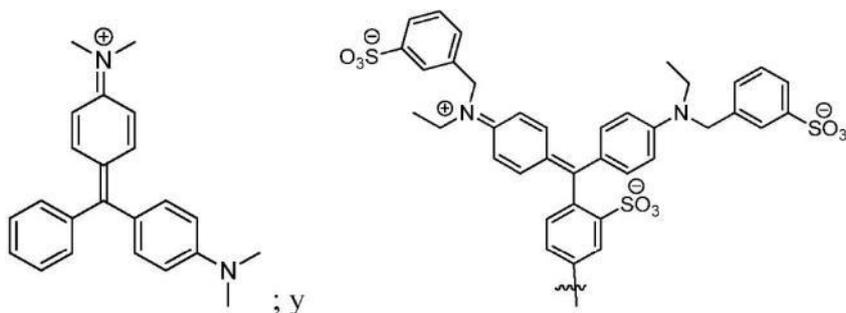
Como se muestra en las FIGS. 4 y 5, los QMP se sintetizan para permitir el uso de muchos marcadores detectables o restos indicadores diferentes, tales como haptenos, tintes y otras marcas de detección ( $R^4$  en las fórmulas I-VI), para determinar la presencia de una diana en una muestra. Los marcadores detectables adecuados incluyen luminóforos (fósforos, fluoróforos), cromóforos y/o haptenos. Un luminóforo es un compuesto que puede presentar luminiscencia, incluyendo fosforescencia o fluorescencia. La luminiscencia es la emisión de luz por un compuesto provocada por la absorción de energía excitación en forma de fotones, partículas cargadas o cambios químicos. Un fluoróforo es un compuesto fluorescente que absorbe luz de una longitud de onda específica y reemite luz a una longitud de onda mayor. Un cromóforo es una especie que puede absorber luz visible. Un cromóforo preferente puede absorber una cantidad suficiente de luz visible con especificidad de longitud de onda suficiente de modo que el cromóforo se pueda visualizar usando iluminación de campo claro. Un hapteno es una molécula, típicamente una molécula pequeña que puede combinar específicamente con un anticuerpo, pero típicamente no puede ser sustancialmente inmunógena excepto en combinación con una molécula transportadora. Determinados luminóforos, fluoróforos y cromóforos también son haptenos. Varios marcadores detectables ejemplares se muestran en la FIG. 2(A).

Aunque no es exhaustivo, el documento WO2012024185 proporciona la divulgación con respecto a cromógenos y haptenos actualmente disponibles. Los modos de realización de marcadores detectables incluyen haptenos, tales como pirazoles, en particular nitropirazoles; compuestos de nitrofenilo; benzofurazanos; triterpenos; ureas y tioureas, en particular fenilureas, e incluso más en particular feniltioureas; rotenona y derivados de rotenona, también denominadas en el presente documento rotenoides; oxazol y tiazoles, en particular sulfonamidas de oxazol y tiazol; cumarina y derivados de cumarina; ciclolignanos, ejemplificados por podofilotoxina y derivados de podofilotoxina; y combinaciones de los mismos. Los modos de realización de haptenos y procedimientos para su preparación y uso se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 7.695.929.

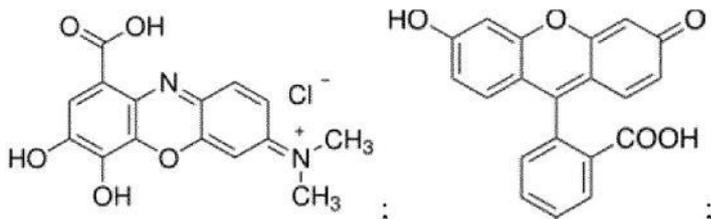
Los haptenos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, BD (benzodiacepina), BF (benzofurazano), DABSILO (4-(dimetilamino)azobenceno-4'-sulfonamida, que tiene una  $\lambda_{\text{máx}}$  de aproximadamente 436 nm), DCC (ácido 7-(dietilamino)cumarin-3-carboxílico), DIG (digoxigenina), DNP (dinitrofenilo), HQ (3-hidroxi-2-quinoxalincarbamida) NCA (ácido nitrocínámico), NP (nitropirazol), PPT (podofilotoxina), Rhod (rodamina), ROT (rotenona) y TS (tiazolsulfonamida). Otros haptenos adecuados incluyen derivados de biotina y fluoresceína (FITC (isotiocianato de fluoresceína), TAMRA (tetrametilrodamina), Texas Red).

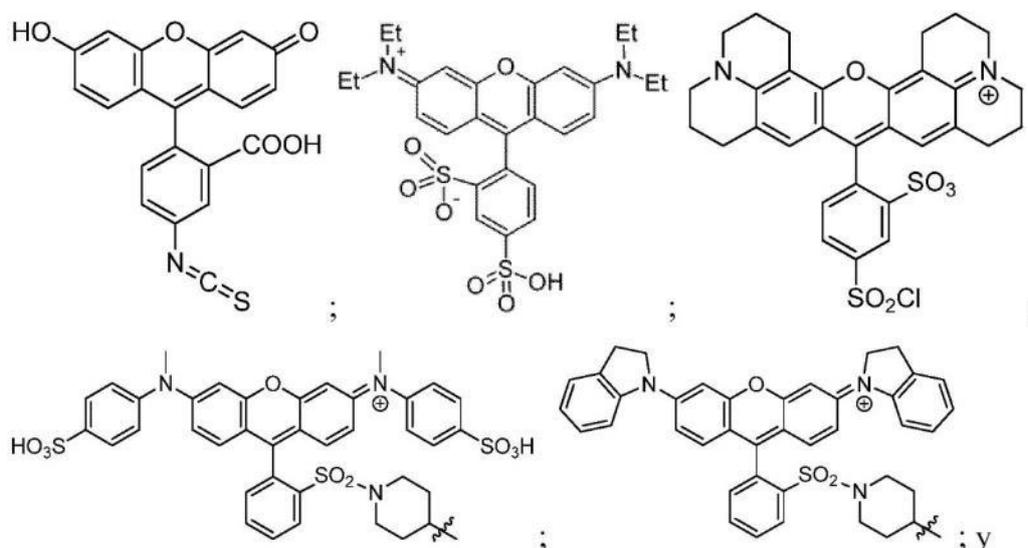
Los cromóforos adecuados incluyen cumarina y derivados de cumarina. Los cromóforos a base de cumarina ejemplares incluyen DCC y ácido 2,3,6,7-tetrahidro-11-oxo-1H,5H,11H-[1]benzopirano[6,7,8-ij]quinolicin-10-carboxílico. Otra clase de restos cromogénicos adecuados para su uso incluye cromógenos que contienen diazo, tales como tartracina, que tiene una  $\lambda_{\text{máx}}$  de aproximadamente 427 nm.

Todavía en otros ejemplos, el cromóforo puede ser un compuesto de triarilmetano. Los cromóforos de triarilmetano ejemplares se proporcionan a continuación:



Los cromóforos anillados ejemplares incluyen, pero no se limitan a:





otros derivados de rodamina, tales como tetrametilrodaminas (incluyendo TMR, TAMRA y derivados de isotiocyanatos reactivos), y derivados de diarilrodamina, tales como los tintes QSY 7, QSY 9 y QSY 21.

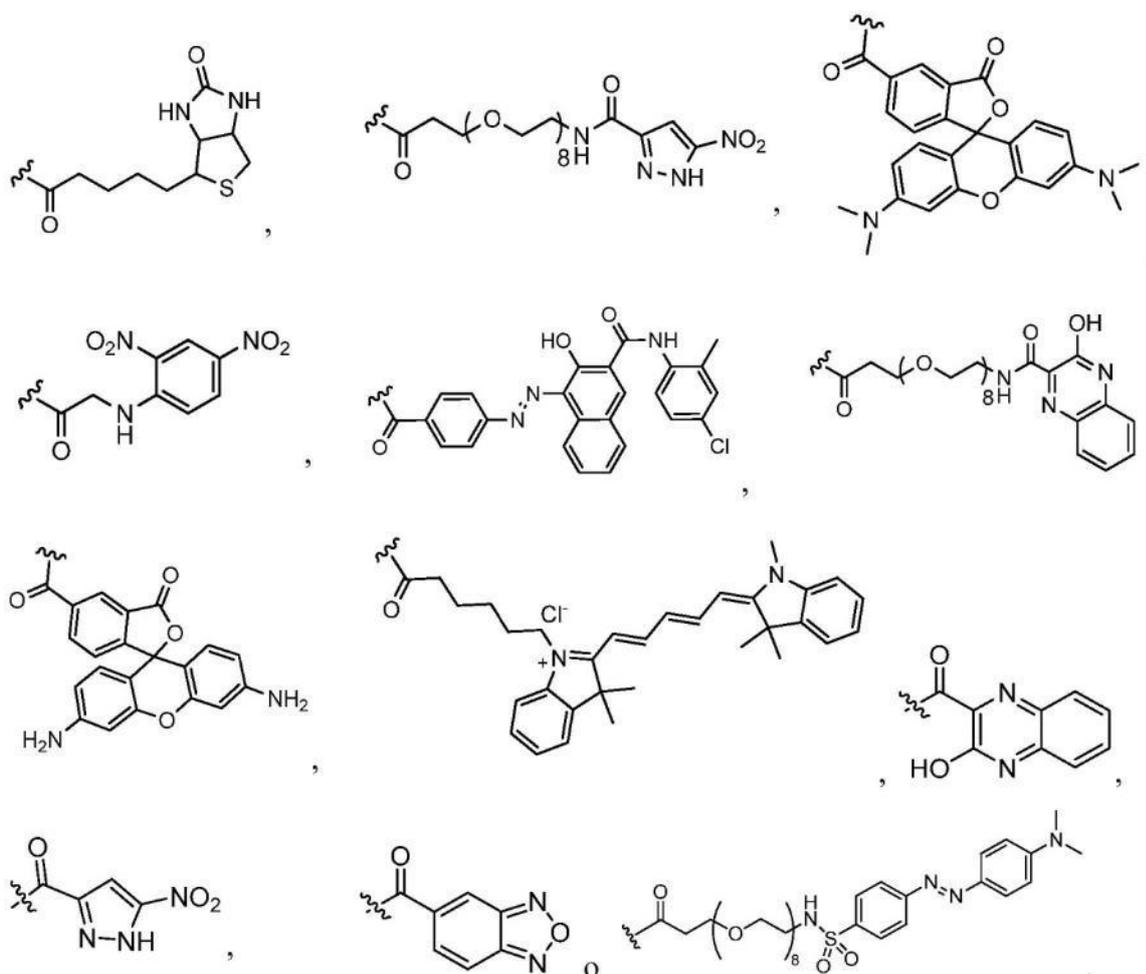
5 Otros marcadores detectables ejemplares incluyen resorufina; DAB; AEC; CN; BCIP/NBT; Fast Red; Fast Blue; fucsina; NBT; ALK GOLD; Cascade Blue acetil acida; ácido dapoxilsulfónico/ácido carboxílico; DY-405; Alexa Fluor<sup>®</sup> 405; Cascade Yellow; piridiloxazol (PyMPO); Pacific Blue; DY-415; ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico; DYQ-425; 6-FAM fosforamidita; Lucifer Yellow; yodoacetamida; Alexa Fluor<sup>®</sup> 430; Dabcilo; NBD cloruro/fluoruro; QSY 35; DY-485XL; Cy2; DY-490; Oregon Green 488 ácido carboxílico; Alexa Fluor<sup>®</sup> 488; BODIPY 493/503 C3; DY-480XL; BODIPY FL C3; BODIPY FL C5; BODIPY FL-X; DYQ-505; Oregon Green 514 ácido carboxílico; DY-510XL; DY-481XL; 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); DY-520XL; DY-521XL; BODIPY R6G C3; eritrosina isotiocianato; 5-carboxi-2',4',5',7'-tetrabromosulfonafluoresceína; Alexa Fluor<sup>®</sup> 532; 6-carboxi-2',4',4',5',7',7'-hexaclorofluoresceína (HEX); BODIPY 530/550 C3; DY-530; BODIPY TMR-X; DY-555; DYQ-1; DY-556; Cy3; DY-547; DY-549; DY-550; Alexa Fluor<sup>®</sup> 555; Alexa Fluor<sup>®</sup> 546; DY-548; BODIPY 558/568 C3; rodamina Red-X; QSY 7; BODIPY 564/570 C3; BODIPY 576/589 C3; carboxi-X-rodamina (ROX); Alexa Fluor<sup>®</sup> 568; DY-590; BODIPY 581/591 C3; DY-591; BODIPY TR-X; Alexa Fluor<sup>®</sup> 594; DY-594; carboxinaftofluoresceína DY-605; DY-610; Alexa Fluor<sup>®</sup> 610; DY-615; BODIPY 630/650-X; erio glaucina; Alexa Fluor<sup>®</sup> 633; Alexa Fluor<sup>®</sup> 635; DY-634; DY-630; DY-631; DY-632; DY-633; DYQ-2; DY-636; BODIPY 650/665-X; DY-635; Cy5; Alexa Fluor<sup>®</sup> 647; DY-647; DY-648; DY-650; DY-654; DY-652; DY-649; DY-651; DYQ-660; DYQ-661; Alexa Fluor<sup>®</sup> 660; Cy5.5; DY-677; DY-675; DY-676; DY-678; Alexa Fluor<sup>®</sup> 680; DY-679; DY-680; DY-682; DY-681; DYQ-3; DYQ-700; Alexa Fluor<sup>®</sup> 700; DY-703; DY-701; DY-704; DY-700; DY-730; DY-731; DY-732; DY-734; DY-750; Cy7; DY-749; DYQ-4; y Cy7.5.

25 En algunos modos de realización, el marcador detectable incluye un resto conector, tal como un resto PEG. En determinados modos de realización, la adición de un resto PEG puede mejorar la intensidad de tinción. Las FIGS. 6 y 7 ilustran el incremento en la intensidad de tinción de derivados de QMP-dabsilo y QMP-TAMRA con conectores PEG, respectivamente. La FIG. 6 proporciona microfotografías de tinción de Bcl-6 en tejido de amígdala a un aumento de 20x, usando fosfato-QMP-dabsilo (250 uM) (FIG. 6(A)), fosfato-QMP-PEG<sub>4</sub>-dabsilo (250 uM) (FIG. 6 (B)) y fosfato-QMP-PEG<sub>8</sub>-dabsilo (250 uM) (FIG. 6(C)). Como muestra la FIG. 6, la inclusión de un conector PEG en un derivado fosfato-QMP-dabsilo incrementa la intensidad de tinción sustancialmente, en comparación con un derivado fosfato-QMP-dabsilo sin un conector PEG (FIGS. 6(A) - 6(C)). Adicionalmente, las FIGS. 6(B) y 6(C) ilustran la diferencia en intensidad de tinción entre la incorporación de restos PEG<sub>4</sub> (FIG. 6(B)) y PEG<sub>8</sub> (FIG. 6(C)) en derivados de fosfato-QMP-dabsilo. Además, el resto PEG<sub>8</sub> incrementa la intensidad de tinción respecto del resto PEG<sub>4</sub>.

35 Se muestra un resultado similar en la FIG. 7, que ilustra el incremento en intensidad de tinción logrado por la incorporación de conectores PEG en derivados de fosfato-QMP-TAMRA. La FIG. 7 proporciona microfotografías de tinción de Bcl-6 en tejido de amígdala a un aumento de 20x, usando fosfato-QMP-TAMRA (250 uM) (FIG. 7(A)), fosfato-QMP-PEG<sub>4</sub>-TAMRA (250 uM) (FIG. 7 (B)) y fosfato-QMP-PEG<sub>8</sub>-TAMRA (250 uM) (FIG. 7(C)).

40 Las FIGS. 6 y 7 ilustran que la incorporación de PEG en el conector da lugar a un incremento en la intensidad de tinción funcional. Sin embargo, también puede dar lugar a un incremento en la difusión de señal para los derivados de TAMRA, en especial con el conector PEG<sub>8</sub> (FIG. 7(C)).

45 Con referencia a las fórmulas I-III, en modos de realización particulares el marcador detectable -R<sup>4</sup> o conector-marcador detectable (-R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>) es



En otros ejemplos particulares, el marcador detectable  $-R^4$  o conector-marcador detectable ( $-R^3R^4$ ) es biotina con un conector alifático, nitropirazol (NP), NP con un conector PEG-8, TAMRA, DNP, Fast Red, HQ, HQ con un conector PEG-8, benzofurazano, Rhod 110, dabsilo con un conector PEG-8 o Cy5. También se pueden usar puntos cuánticos, polímeros quelantes de lantánidos, y/u otros lumíforos y tintes basados en polímeros.

#### iv) Conectores

Con respecto a los conectores  $R^3$  para las fórmulas I-III, se puede usar cualquier conector adecuado para formar conjugados de la presente divulgación por acoplamiento a marcadores detectables, tales como cromógenos, haptenos, fluoróforos o luminóforos, como se divulga en el presente documento. Los conectores útiles pueden ser homo o bien heterobifuncionales, pero más típicamente son heterobifuncionales.

Únicamente a modo de ejemplo, y sin limitación, una primera clase de conectores incluye compuestos alifáticos, tales como cadenas de hidrocarburo alifático que tienen uno o más sitios de insaturación, o cadenas de alquilo. La cadena alifática también incluye típicamente grupos funcionales terminales, incluyendo a modo de ejemplo y sin limitación, un grupo reactivo de carbonilo, un grupo reactivo de amina, un grupo reactivo de tiol, un grupo reactivo de carbono o un grupo fotorreactivo, que facilitan el acoplamiento a un marcador detectable como se divulga en el presente documento. La longitud de la cadena puede variar, pero típicamente tiene un límite práctico superior de aproximadamente 30 átomos. Se ha demostrado que las uniones de cadena mayores de aproximadamente 30 átomos de carbono son menos eficaces que los compuestos que tienen uniones de cadena más pequeñas. Por tanto, los conectores de cadena alifática típicamente tienen una longitud de cadena de desde aproximadamente 1 átomo de carbono a aproximadamente 30 átomos de carbono. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que, si un conector particular tiene más de 30 ámbitos, y todavía funciona eficazmente para unir el marcador detectable al QMP, y el conjugado todavía funciona como se desea, entonces dichos conectores están dentro del alcance de la presente divulgación.

Una segunda clase de conectores útiles para practicar los modos de realización de la presente divulgación son los óxidos de alqueno. Los óxidos de alqueno se representan en el presente documento por referencia a glicoles, tales como etilenglicoles. Un experto en la técnica apreciará que, a medida que se incrementa el número de átomos de

oxígeno, también puede incrementar la hidrofilia. Por tanto, los conectores adecuados pueden tener una fórmula de  $(-OCH_2CH_2O-)_n$  donde n es de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, pero más típicamente es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8.

- 5 Los conectores de polialquilenglicol heterobifuncionales útiles para practicar determinados modos de realización divulgados se describen en solicitudes del cesionario, incluyendo "Nanoparticle Conjugates", solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/413.778, presentada el 28 de abril de 2006; "Antibody Conjugates", solicitud de EE. UU. n.º 11/413.418, presentada el 27 de abril de 2006; y "Molecular Conjugate" solicitud de EE. UU. n.º 11/603.425, presentada el 21 de noviembre de 2006. Los conectores de polialquilenglicol heterobifuncionales se divulgan a  
10 continuación, y su uso se ejemplifica por referencia a acoplar tiramina a marcadores detectables.

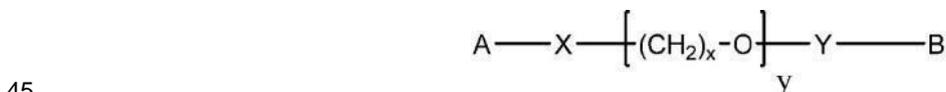
Un ejemplo particular de un conector para su uso con conjugados divulgados es un conector de polialquilenglicol heterobifuncional que tiene la estructura general mostrada a continuación:



- en la que A y B incluyen diferentes grupos reactivos, x es un número entero de 2 a 10 (tal como 2, 3 o 4), e y es un número entero de 1 a 50, por ejemplo, de 2 a 30 tal como de 3 a 20 o de 4 a 12. Uno o más átomos de hidrógeno se  
20 pueden sustituir por grupos funcionales adicionales tales como grupos hidroxilo, grupos alcoxi (tales como metoxi y etoxi), grupos halógeno (F, Cl, Br, I), grupos sulfato y grupos amino (incluyendo grupos amino mono y disustituidos tales como grupos dialquilamino).

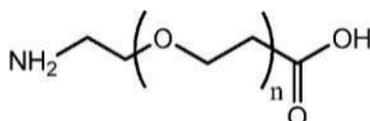
- A y B del conector independientemente son grupos funcionales reactivos, tales como un grupo reactivo de carbonilo, un grupo reactivo de amina, un grupo reactivo de tiol, un grupo reactivo de carbono o un grupo fotorreactivo. A y B  
25 típicamente no son el mismo grupo funcional reactivo. Los ejemplos de grupos reactivos de carbonilo incluyen grupos reactivos de aldehído y cetona como derivados de hidracina y aminas. Los ejemplos de grupos reactivos de amina incluyen ésteres activos tales como NHS o sulfo-NHS, isotiocianatos, isocianatos, acil-acidas, cloruros de sulfonilo, aldehídos, glioxales, epóxidos, oxiranos, carbonatos, haluros de arilo, imidoésteres, anhídridos y similares. Los ejemplos de grupos reactivos de tiol incluyen aceptores de Michael no polimerizables, grupos haloacetilo (tales como yodoacetilo), haluros de alquilo, maleimidas, aziridinas, grupos acrilóilo, vinilsulfonas, benzoquinonas, grupos  
30 aromáticos que se pueden someter a sustitución nucleófila tales como grupos fluorobenceno (tales como grupos tetra y pentafluorobenceno), y grupos disulfuro tales como grupos piridildisulfuro y tioles activados con reactivo de Ellman. Los ejemplos de grupos reactivos de carbono incluyen grupos haloalquilo tales como clorometilo. Los ejemplos de grupos fotorreactivos incluyen aril-acida y aril-acidas halogenadas. De forma alternativa, A y/o B pueden ser un grupo funcional que reacciona con un tipo específico de grupo reactivo. Por ejemplo, A y/o B pueden ser un  
35 grupo amina, un grupo tiol o un grupo que contiene carbonilo que reaccionará con un grupo reactivo correspondiente (tal como un grupo reactivo de amina, grupo reactivo de tiol o grupo reactivo de carbonilo, respectivamente) que se ha introducido o está presente de otro modo en un hapteno y/o una tiramina o derivado de tiramina. Los ejemplos adicionales de cada uno de estos tipos de grupos serán evidentes para los expertos en la técnica. Otros ejemplos e información relativa a condiciones de reacción y procedimientos para intercambiar un tipo de grupo reactivo por otro se proporcionan en Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press, San Diego, 1996.

- El conector heterobifuncional puede tener la fórmula:



- en la que A y B son grupos reactivos diferentes y son como se establece anteriormente; x e y son como se establece anteriormente, y X e Y son grupos espaciadores adicionales, por ejemplo, grupos espaciadores que tienen entre 1 y 10 carbonos tales como entre 1 y 6 carbonos o entre 1 y 4 carbonos, y opcionalmente que contienen una o más uniones amida, uniones éter, uniones éster y similares. Los espaciadores X e Y pueden ser iguales o diferentes, y pueden ser de cadena lineal, ramificados o cíclicos (por ejemplo, estructuras cíclicas aromáticas o alifáticas), y pueden estar insustituidos o sustituidos. Los grupos funcionales que pueden ser sustituyentes en un espaciador incluyen grupos carbonilo, grupos hidroxilo, átomos de halógeno (F, Cl, Br y I), grupos alcoxi (tales como metoxi y etoxi), grupos nitro y grupos sulfato.

- 55 En particular, el conector heterobifuncional puede comprender un conector de polietilenglicol heterobifuncional que tiene la fórmula:



en la que  $n = 1$  a 50, por ejemplo,  $n = 2$  a 30 tal como  $n = 3$  a 20 o  $n = 4$  a 12. En modos de realización particulares,  $n = 4$  o 8.

5 Otra clase de conectores son conectores arilo. Los conectores arilo pueden ser restos carbocíclicos o heterocíclicos, tales como fenilo, piridilo, pirolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, oxazolilo o tiazolilo. En determinados modos de realización, el conector es un triazol, tal como un 1,2,3 triazol. El grupo arilo se puede unir al marcador detectable y/o restos QMP a través de un carbono o bien un heteroátomo. En un modo de realización ejemplar, el triazol se forma por una reacción entre una acida y un alquino, tal como un resto QMP que comprende un alquino y un marcador detectable funcionalizado con acida, o un marcador detectable que comprende un alquino y un resto QMP funcionalizado con acida (véase, por ejemplo, ejemplo 2, esquema 11). La acida y/o alquino se puede unir a los restos respectivos por medio de un grupo conector, tal como un resto conector divulgado en el presente documento, o se puede unir directamente a través de un enlace covalente. En algunos modos de realización, la acida y/o alquino se puede unir por medio de una cadena alifática, tal como una cadena de alquilo o cadena de alquilo inferior. En otros modos de realización, la acida y/o alquino se une por medio de un conector polialquilenglicol.

Varios conectores ejemplares se muestran en la FIG. 2(A), tercer panel, y en los ejemplos.

### 20 III. Procedimientos de uso

Los modos de realización de las QM divulgadas y sus precursores son útiles para detectar dianas, por ejemplo, detectar una diana en una muestra biológica. La detección se puede realizar, por ejemplo, usando técnicas de inmunohistoquímica y/o técnicas de hibridación *in situ*.

25 En algunos modos de realización, se detecta una diana, tal como un biomarcador, dentro de un tejido. En determinados modos de realización, el tejido es tejido incluido en parafina fijado en formol (FFPE). Como se entiende por los expertos en la técnica, "tejido" como se usa en el presente documento puede comprender además frotis de células de cervicouterinas, tejidos congelados, células tumorales circulantes en portaobjetos de vidrio y frotis de sangre. Por tanto, por ejemplo, los frotis de células cervicouterinas se pueden usar en preparaciones de citología, etc.

30 Como se describe ahora con referencia a la FIG. 3(A) - (C) y se detalla además en los ejemplos a continuación, algunos modos de realización de procedimiento incluyen poner en contacto la muestra 200 (por ejemplo, tejido), que incluye la diana 202 con el anticuerpo 204. En algunos modos de realización, se pueden detectar dianas con un anticuerpo primario que no se conjuga a enzimas, y se usa un anticuerpo secundario para detectar el anticuerpo primario asociado con la diana. En otro enfoque, el resultado es la localización de la enzima 206 en estrecha proximidad con la diana 202. El modo de realización de la FIG. 3 incluye además poner en contacto el tejido con un conjugado de QMP 208 que comprende (i) un grupo fosfato o fosfodiéster y (ii) un marcador detectable o indicador 216. Aunque se muestra como un anticuerpo, se puede usar cualquier resto de unión adecuado, por ejemplo oligómeros de ácido nucleico, tales como oligómeros de ácido nucleico marcados con hapteno, y anticuerpos que pueden reconocer y unirse a la diana. El marcaje de la diana 202 con la enzima 206 puede incluir poner en contacto el tejido con el conjugado enzima-anticuerpo que comprende un anticuerpo 204 al que se une la enzima 206. El anticuerpo 204 puede reconocer y unirse específicamente a la diana. El QMP 208 interactúa con la enzima 206 para formar un intermedio fenol 210 que se reordena para formar una QM 212, que reacciona con el resto de unión, la enzima 206, el anticuerpo 204, o el tejido para unir covalentemente el marcador detectable 216 directamente en o de forma proximal a la diana 202. A continuación se detecta el marcador detectable 216 usando un procedimiento apropiado para el marcador detectable particular.

50 En modos de realización particulares, el QMP incluye un fosfato, la enzima es una fosfatasa, y el marcador detectable es un cromógeno, un fluoróforo, un luminóforo o un hapteno. En algunos ejemplos, se puede usar fosfatasa alcalina como la fosfatasa.

55 En algunos modos de realización, el anticuerpo 204 reconoce y se une directamente a la diana 202 como se muestra en la FIG. 3(A). En otros modos de realización, un anticuerpo se puede unir indirectamente a cualquier resto de unión específica. Por ejemplo, un anticuerpo anti-resto de unión, marcado con hapteno, se puede unir en primer lugar al resto de unión, seguido de un conjugado enzima-anticuerpo anti-hapteno.

60 Todavía otros ejemplos implican un procedimiento para formar una composición de amplificación con inmunohistoquímica (IHQ) o hibridación *in situ* (ISH) que comprende un QMP. Un aspecto ejemplar comprende la etapa de escindir un grupo fosfato o fosfodiéster unido covalentemente a un carbono o carbonos adyacentes, respectivamente, en un sistema conjugado (por ejemplo, un sistema de anillo aromático). Cuando el QMP incluye un grupo fosfato, un reordenamiento electrónico da como resultado la eliminación de un grupo saliente (LG) de un carbono *orto* o *para* al grupo fosfato. La reacción se realiza en condiciones adecuadas para la formación de la QM. El precursor comprende además un marcador detectable unido al sistema conjugado por un conector.

65 En algunos modos de realización, la identidad del grupo saliente y/o la concentración del conjugado de QMP puede

influir en la especificidad de detección de la diana (por ejemplo, tinción). La reactividad de la QM depende al menos en parte de la tasa de formación de QM, y por lo tanto de la capacidad de grupo saliente del LG. Los LG malos pueden tener una tasa menor de formación de QM, lo que da como resultado una mala especificidad debido a la alta estabilidad de QM y alta difusión desde el sitio de generación. En algunos modos de realización, la identidad de R<sup>5</sup> y/o R<sup>6</sup> también afecta a la especificidad de detección de la diana (por ejemplo, tinción). Por ejemplo, determinados grupos (por ejemplo, grupos grandes) en R<sup>5</sup> y/o R<sup>6</sup> pueden impedir estéricamente la capacidad de QM de reaccionar con y unirse a un nucleófilo.

En determinados modos de realización, cuando el grupo saliente fue fluoruro (por ejemplo, LG = F), se obtuvieron resultados superiores, lo que da como resultado una tinción IHQ amplificada específica en la que las áreas teñidas cuando se aumenta tienen perímetros bien definidos marcados. Sin quedar vinculado a ninguna teoría particular de funcionamiento, un grupo saliente fluoruro puede producir un QMP más reactivo, dando como resultado una rápida conversión a una QM y posterior unión próxima a la diana. Los QMP menos reactivos se pueden difundir lejos de la diana durante el tiempo entre la escisión del grupo de reconocimiento de enzima y la eliminación del grupo saliente, seguido del depósito y unión de la QM al sitio nucleófilo. Adicionalmente, las concentraciones de conjugado de QMP nanomolares (por ejemplo, de 10 nM a 100 nM) pueden facilitar la tinción específica.

Otros modos de realización de procedimiento se refieren a un procedimiento de amplificación con inmunohistoquímica o hibridación *in situ* que incluyen poner en contacto una muestra con una composición de amplificación con inmunohistoquímica o hibridación *in situ* que comprende un compuesto de acuerdo con las estructuras divulgadas en el presente documento; y poner en contacto la composición de amplificación con un reactivo en condiciones adecuadas para efectuar la detección.

Aún otros modos de realización implican un procedimiento de detección de dos o más dianas distintas en una muestra de tejido. Un modo de realización ejemplar comprende: poner en contacto el tejido con un primer resto de unión específico para una primera diana, y un segundo resto de unión específico para una segunda diana. La primera diana se marca con una primera enzima a través del primer resto de unión, y la segunda diana se marca con una segunda enzima a través del segundo resto de unión. A continuación, el tejido se pone en contacto con un QMP que comprende (i) un grupo de reconocimiento de enzima, y (ii) un marcador detectable, y un segundo compuesto precursor de detección (por ejemplo, un segundo QMP o un compuesto de tiramida marcado), en el que el QMP interactúa con la primera enzima para formar una QM que reacciona con el tejido para unir covalentemente el marcador detectable directamente en o de forma proximal a la primera diana, y el segundo compuesto precursor de detección interactúa con la segunda enzima para depositar un segundo compuesto de detección directamente en o de forma proximal a la segunda diana. A continuación se detectan los compuestos detectables.

De forma ventajosa, para los procedimientos recién descritos, la primera enzima y la segunda enzima son enzimas diferentes. Por ejemplo, la primera enzima puede ser una fosfatasa o fosfodiesterasa, y la segunda enzima puede ser una peroxidasa. En determinados modos de realización, la primera enzima es fosfatasa alcalina y la segunda enzima es peroxidasa de rábano picante. También de forma ventajosa, la primera enzima no interactúa con el segundo compuesto precursor de detección para depositar el segundo compuesto de detección de forma proximal a la primera diana, y/o la segunda enzima no interactúa con el QMP para formar la QM. En otras palabras, la primera enzima reacciona específicamente con el QMP y la segunda enzima reacciona específicamente con el segundo compuesto precursor de detección. Por ejemplo, la primera enzima puede ser una fosfatasa y la segunda enzima una  $\beta$ -galactosidasa. En este ejemplo, la primera enzima, la fosfatasa, no reacciona con el QMP que comprende un  $\beta$ -galactósido, y la segunda enzima, la  $\beta$ -galactosidasa, no reacciona con el QMP que comprende el fosfato. De forma ventajosa, estos procedimientos no incluyen una etapa de desactivación enzimática.

En interés de la eficacia, los dos o más procedimientos de amplificación de diana se pueden practicar poniendo en contacto el tejido con el primer resto de unión específico para la primera diana y poniendo en contacto el tejido con el segundo resto de unión específico para la segunda diana de modo que se produzcan de forma sustancialmente contemporánea. El primer y segundo restos de unión también se pueden poner en contacto con la primera y segunda enzimas de forma sustancialmente contemporánea. Adicionalmente, el tejido se puede poner en contacto con el QMP y el segundo compuesto precursor de detección de forma sustancialmente contemporánea. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que el tejido se puede poner en contacto en serie con el primer resto de unión seguido del segundo resto de unión, y viceversa. De forma similar, la primera diana se puede marcar por la primera enzima seguido del marcaje de la segunda diana con la segunda enzima, y viceversa. Además, el tejido se puede poner en contacto en serie con el QMP seguido del segundo compuesto precursor de detección, y viceversa.

La FIG. 8 ilustra los resultados de incubación de anticuerpo simultánea seguida de detección cromogénica secuencial. En la FIG. 8, se detecta Her2 por un anticuerpo GAR conjugado a HRP, y Pan-Keratin se pone en contacto con un anticuerpo GAM conjugado a AP. La detección secuencial por tiramida-TAMRA y QMP-PEG<sub>8</sub>-dabsilo dio como resultado la imagen mostrada en la FIG. 8(A). Y la FIG. 9 muestra los resultados de un ensayo de detección secuencial cuádruple, que detecta CD8 (Tyr-rodamina-110, granate), CD3 (QMP-Cy5, azul), FoxP3 (Tyr-TAMRA, morado) y Pan-Keratin (QMP-dabsilo, amarillo) en tejido de amígdala.

En determinados modos de realización, se detectan dos dianas, de forma secuencial o bien de forma

5 sustancialmente simultánea, en un ensayo doble. Los precursores de detección pueden ser, por ejemplo, dos QMP que comprenden diferentes grupos de reconocimiento de enzima, o un QMP y un procedimiento de detección no basado en QMP, tal como TSA basada en HRP. En determinados ejemplos, un ensayo doble comprende un QMP que comprende un fosfato, y una tiramina, para la reacción con una fosfatasa alcalina y HRP respectivamente. El procedimiento de detección puede ser IHQ cromogénica o fluorescente. La FIG. 10 proporciona una microfotografía de un ensayo doble fluorescente que utiliza detecciones tanto de QMP basado en AP y TSA basada en HRP, pero sin una etapa de inactivación enzimática. En otros ejemplos, un ensayo doble comprende un QMP que comprende un fosfato y un QMP que comprende un  $\beta$ -galactósido.

10 Se puede usar un ensayo triple para detectar tres dianas. Un ensayo triple puede usar tres QMP con diferentes grupos de reconocimiento de enzima, o una combinación de QMP y otros procedimientos de detección, tales como TSA basada en HRP. En determinados ejemplos, un ensayo triple incluye un QMP que comprende un fosfato, un QMP que comprende un  $\beta$ -galactósido y una tiramina, para la reacción con una fosfatasa alcalina, una  $\beta$ -galactosidasa y HRP respectivamente. El ensayo puede ser un ensayo secuencial o un ensayo sustancialmente simultáneo. En algunos ejemplos, el procedimiento de detección es IHQ cromogénica.

15 Se puede usar un ensayo cuádruple para detectar cuatro dianas. Un ensayo cuádruple puede usar cuatro QMP con diferentes grupos de reconocimiento de enzima, o una combinación de QMP y otros procedimientos de detección, tales como TSA basada en HRP. En algunos ejemplos, el ensayo cuádruple comprende la adición secuencial de un QMP que comprende un fosfato que reacciona con una fosfatasa alcalina, un QMP que comprende un  $\beta$ -galactósido que reacciona con una  $\beta$ -galactosidasa y dos adiciones secuenciales de tiramina, de las que cada una reacciona con HRP. En otros ejemplos, el ensayo cuádruple comprende un QMP que comprende un fosfato que reacciona con una fosfatasa alcalina, un QMP que comprende un  $\beta$ -galactósido que reacciona con una  $\beta$ -galactosidasa, y tiramina y DAB, de las que cada una reacciona con HRP. El procedimiento de detección para un cuádruple puede ser IHQ cromogénica.

20 En ensayos múltiples que usan diferentes enzimas para cada etapa de detección, los ensayos descritos actualmente no requieren etapas de inactivación enzimática, reduciendo de este modo el tiempo y el desperdicio de reactivos. Además, debido a que QM y TSA se unen a diferentes sitios reactivos sobre el tejido, los marcadores con expresión conjunta se pueden detectar con seguridad sin la posibilidad de que la primera etapa de detección agote los sitios reactivos para la segunda.

25 Algunos ejemplos se refieren a un procedimiento para marcar un oligonucleótido. Un oligonucleótido se combina con un QMP que comprende (i) un grupo de reconocimiento de enzima, y (ii) un marcador detectable como se describe en el presente documento. A continuación se añade una enzima (por ejemplo, una fosfatasa, fosfodiesterasa, etc.) al oligonucleótido y QMP combinados. La enzima cataliza la conversión del QMP en una QM reactiva que se une covalentemente al oligonucleótido para formar un oligonucleótido marcado. En algunos ejemplos, el marcador detectable es un hapteno, tal como un fluoróforo. En un modo de realización, el QMP comprende un grupo fosfato o fosfodiestéer y la enzima es fosfatasa alcalina. En algunos ejemplos, el QMP se usa en un ensayo de amplificación con ISH, tal como para detectar amplificación génica.

30 En determinados modos de realización, el oligonucleótido es una sonda de detección que puede reconocer y unirse específicamente a una diana dentro de una muestra, tal como una muestra biológica. El procedimiento puede incluir además poner en contacto la muestra con el oligonucleótido marcado, de este modo el oligonucleótido marcado se une a la diana, y a continuación detectar la diana detectando el marcador. En contraste con algunos agentes de marcaje de oligonucleótidos (por ejemplo, reactivos basados en aziridinio (por ejemplo, Mirus, Madison, WI)), determinados modos de realización de QMP marcados con hapteno o fluoróforo son no tóxicos.

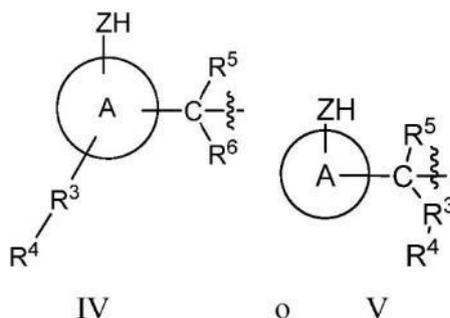
35 El comportamiento de tinción funcional de QMP es sensible a diversos factores incluyendo tiempo de reacción, temperatura, concentración de sustrato, concentración de sal y el pH del medio de reacción. Un pH eficaz puede ser de más de 7 a 14, tal como de 8 a 12, o de 9 a 11. La concentración de QMP puede ser de más de cero a 1 mM o mayor, tal como de 50 nM a 500  $\mu$ M, de 50 nM a 100  $\mu$ M, o de 100 nM a 1  $\mu$ M. En determinados ejemplos con respecto a la tinción cromogénica, la concentración es de 10  $\mu$ M a 750  $\mu$ M, o de 50  $\mu$ M a 500  $\mu$ M. En determinados ejemplos con respecto a la tinción fluorescente y/o amplificación con hapteno, la concentración es de 10 nM a 50  $\mu$ M, o de 50 nM a 10  $\mu$ M. Estos factores permiten que se altere tanto la intensidad como la difusividad de la mancha de manera predecible. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que las condiciones de tinción también deben ser compatibles con la enzima. Por ejemplo, cambiar el tampón, pH, cofactores, etc. hasta un grado tal que la actividad de la enzima se reduzca sustancialmente puede tener un efecto negativo sobre el comportamiento de tinción del QMP.

40 Un ejemplo del efecto de pH se ilustra por las FIGS. 11 y 12. Sin quedar vinculado a ninguna teoría particular, a un pH relativamente bajo de 7,5, estaban presentes menos nucleófilos hidróxidos en el medio de reacción. El resultado fue una vida de QM más larga, lo que da lugar a una señal más intensa junto con una mayor difusión (FIG. 11). El incremento del pH a 10 incrementó la concentración de nucleófilos hidróxidos, disminuyendo eficazmente la vida de QM. El resultado fue una disminución de la señal con mucha menos difusión (FIG. 12).

Una concentración de sal eficaz puede ser de más de cero a al menos 2 M, como de 0,1 M a 2 M, de 0,25 M a 1,5 M, o de 0,5 M a 1,25 M. En determinados modos de realización, la concentración de sal es de aproximadamente 1 M. La sal puede ser cualquier sal eficaz para actuar como cofactor de la enzima, para mejorar la intensidad de señal y/o para mejorar la calidad de tinción. La calidad de señal se puede mejorar debido a una mejora en la localización, separación y/o difusión reducida de la señal. En algunos ejemplos, la sal es cloruro de magnesio o cloruro de sodio.

#### IV. Conjugados de análogos de quinona metida

Además dentro del alcance de la presente divulgación son conjugados que incluyen modos de realización de las QM divulgadas. En algunos ejemplos, un conjugado comprende una QM unida covalentemente a otra sustancia, por ejemplo, una muestra biológica, un oligonucleótido, un anticuerpo, o una enzima. La QM unida tiene una estructura general de acuerdo con las fórmulas IV o V:



en las que A es un sistema conjugado; Z es O, S o NR<sup>a</sup> donde R<sup>a</sup> es hidrógeno o alifático, típicamente alquilo; R<sup>3</sup> es un enlace o un conector; R<sup>4</sup> es un marcador detectable; y R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> independientemente son hidrógeno, halo, ciano, alquilo inferior, haloalquilo inferior, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup> o -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub> donde cada R<sup>c</sup> independientemente es hidrógeno, arilo, alifático o heteroalifático, o dos restos R<sup>c</sup> conjuntamente forman un anillo heteroalifático. En determinados ejemplos, R<sup>4</sup> es un hapteno, un cromógeno, un fluoróforo, o un luminóforo.

#### V. Ejemplos automatizados

Un experto en la técnica apreciará que los ejemplos del procedimiento divulgado en el presente documento para el uso de QMP se pueden automatizar. Ventana Medical sistemas, Inc. es el cesionario de varias patentes de los Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de EE. UU. n.º 5.650.327, 5.654.200, 6.296.809, 6.352.861, 6.827.901 y 6.943.029, y las solicitudes publicadas de EE. UU. n.º 20030211630 y 20040052685.

#### VI. Dianas

Los modos de realización del QMP y el procedimiento divulgado en el presente documento se pueden usar para identificar y/o cuantificar muchas dianas biológicas diferentes. En toda la presente divulgación, cuando se hace referencia a una diana, se entiende que la diana puede ser una proteína diana y que cualquier polinucleótido asociado con esa proteína también se puede usar como diana. La diana puede ser una molécula de proteína o ácido nucleico de un patógeno, tal como un virus, bacteria o parásito intracelular, tal como de un genoma vírico. Por ejemplo, una proteína diana se puede producir a partir de un polinucleótido diana asociado con (por ejemplo, correlacionado con, causalmente implicado en, etc.) una enfermedad. En determinados ejemplos divulgados, la diana (o dianas) de interés puede ser una secuencia de ácido nucleico particular que puede comprender una anomalía genética, tal como un polimorfismo mononucleotídico, metilación del promotor, expresión de ARNm, ARNip, un cambio de número de copias particular, una mutación, un determinado nivel de expresión, un reordenamiento, o combinación de los mismos. En algunos ejemplos, las dianas son proteínas solubles obtenidas de muestras biológicas, tales como suero, plasma, y/u orina. Algunos ejemplos del procedimiento divulgado se pueden usar para detectar y cuantificar ADN, ARN y proteínas de la misma diana (por ejemplo, HER2) simultáneamente de la misma muestra (por ejemplo, de la misma sección de tejido).

El procedimiento divulgado se puede usar para detectar microARN (miARN o miA). Los microARN son ARN no codificantes pequeños que regulan negativamente la expresión génica, tal como por represión de la traducción. Por ejemplo, miR-205 regula la transición epitelial a mesenquimal (EMT), un proceso que facilita la remodelación tisular durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, la EMT también es una etapa temprana de metástasis tumoral. La regulación por disminución de los microARN, tales como miR-205, puede ser una etapa importante en la progresión tumoral. Por ejemplo, la expresión de miR-205 se regula por disminución o se pierde en algunos cánceres de mama. También se puede usar MiR-205 para estratificar carcinomas epidermoides y broncopulmonares no microcíticos (*J. Clin. Oncol.*, 2009, 27(12):2030-7). Se ha descubierto que otros microARN modulan las cascadas de señalización

angiogénicas. La regulación por disminución de miR-126, por ejemplo, puede agravar la progresión del cáncer a través de la angiogénesis y del incremento en la inflamación. Por tanto, los niveles de expresión de microARN pueden ser indicativos de un estado de enfermedad.

- 5 Una secuencia de ácido nucleico diana puede variar sustancialmente de tamaño. Sin limitación, la secuencia de ácido nucleico puede tener un número variable de residuos de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico diana puede tener al menos aproximadamente 10 residuos de ácido nucleico, o al menos aproximadamente 20, 30, 50, 100, 150, 500, 1000 residuos. De forma similar, un polipéptido diana puede variar sustancialmente de tamaño. Los polipéptidos diana típicamente incluyen al menos un epítipo que se une a un anticuerpo específico de péptido, o fragmento del mismo. En algunos ejemplos ese polipéptido puede incluir al menos dos epítipos que se unen a un anticuerpo específico de péptido, o fragmento del mismo.

15 En ejemplos no limitantes específicos, una proteína diana se produce por una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) asociada con una neoplasia (por ejemplo, un cáncer). Se han identificado numerosas anomalías cromosómicas (incluyendo translocaciones y otros reordenamientos, amplificación o delección) en células neoplásicas, en especial en células cancerosas, tales como leucemias de linfocitos B y linfocitos T, linfomas, cáncer de mama, cáncer de colon, cánceres neurológicos y similares. En algunos ejemplos, por lo tanto, al menos una porción de la molécula diana se produce por una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) amplificada o delecionada en al menos un subconjunto de células en una muestra. En un ejemplo, se selecciona la secuencia de ácido nucleico diana genómica para incluir un gen (por ejemplo, un oncogén) que se reduplica en una o más neoplasias malignas (por ejemplo, una neoplasia maligna humana). Se sabe que los oncogenes son responsables de varias neoplasias malignas humanas. Por ejemplo, los reordenamientos cromosómicos que implican el gen SYT localizado en la región de punto de ruptura del cromosoma 18q11.2 son comunes entre los tumores de tejidos blandos de sarcoma.

25 Por ejemplo, HER2, también conocido como c-erbB2 o HER2/neu, es un gen que desempeña un papel en la regulación del crecimiento celular (una secuencia genómica HER2 humana representativa se proporciona en GENBANK™ n.º de acceso NC\_000017, nucleótidos 35097919-35138441). El gen codifica un receptor de la superficie celular transmembranaria de 185 kDa que es un miembro de la familia de las tirosina cinasas. HER2 se amplifica en cánceres de mama, ovárico y otros cánceres humanos; por lo tanto, se puede usar un gen HER2 (o una región del cromosoma 17 que incluye el gen HER2) como secuencia de ácido nucleico diana genómica. Otras proteínas pertinentes en el cáncer de mama incluyen el receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR).

35 En otros ejemplos, se selecciona una proteína diana producida a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) que es un gen supresor de tumor que está delecionado (perdido) en células malignas. Por ejemplo, la región p16 (que incluye D9S1749, D9S1747, p16(INK4A), p14(ARE), D9S1748, p15(INK4B), y D9S1752) localizada en el cromosoma 9p21 está delecionada en ciertos cánceres de vejiga. Las delecciones cromosómicas que implican la región distal del brazo corto del cromosoma 1 (que engloba, por ejemplo, SHGC57243, TP73, EGFL3, ABL2, ANGPTL1 y SHGC-1322), y la región pericentromérica (por ejemplo, 19p13-19q13) del cromosoma 19 (que engloba, por ejemplo, MAN2B1, ZNF443, ZNF44, CRX, GLTSCR2 y GFTSCR1) son rasgos moleculares característicos de determinados tipos de tumores sólidos del sistema nervioso central.

45 Los ejemplos mencionados anteriormente se proporcionan únicamente con propósitos de ilustración y no pretenden ser limitantes. Otras numerosas anomalías citogénicas que se correlacionan con la transformación y/o crecimiento neoplásico son conocidas por los expertos en la técnica. Las proteínas diana que se producen por secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico diana genómicas), que se han correlacionado con la transformación neoplásica y que son útiles en los procedimientos divulgados.

50 En otros ejemplos, se selecciona una proteína diana de un virus u otro microorganismo asociado con una enfermedad o afección. La detección de la secuencia de ácido nucleico diana derivada de virus o microorganismo (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) en una muestra de célula o tejido es indicativa de la presencia del organismo. Por ejemplo, el péptido, polipéptido o proteína diana se puede seleccionar del genoma de un virus oncógeno o patógeno, una bacteria o un parásito intracelular (tal como *Plasmodium falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, *Leishmania* (sp.), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, y *Giardia lamblia*, así como especies de *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria* y *Babesia*). En algunos ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) de un genoma vírico.

60 En determinados ejemplos, la proteína diana se produce a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) de un virus oncógeno, tal como el virus de Epstein-Barr (VEB) o un papilomavirus humano (PVH, por ejemplo, HPV16, HPV18). En otros ejemplos, la proteína diana producida a partir de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico diana genómica) es de un virus patógeno, tal como un virus respiratorio sincicial, un virus de hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis C), un coronavirus (por ejemplo, virus SARS), un adenovirus, un poliomavirus, un citomegalovirus (CMV), o un virus del herpes simple (VHS).

65

## VII. Kits

- 5 En modos de realización ilustrativos, un kit incluye una composición que comprende un QMP divulgado en el presente documento. En determinados modos de realización, un kit también comprende uno o más conjugados enzima-anticuerpo, tales como un conjugado fosfatasa-anticuerpo o un conjugado fosfodiesterasa-anticuerpo. En algunos ejemplos, el kit incluye un conjugado fosfatasa alcalina/anticuerpo anti-especie o un conjugado fosfatasa alcalina/anticuerpo anti-hapteno. El kit también puede incluir un ajuste de pH y/o cofactores enzimáticos.
- 10 En algunos modos de realización, el QMP se almacena en un disolvente orgánico, tal como DMSO, o en una mezcla de disolvente orgánico/tampón acuoso, con tampón acuoso hasta un 100 %. El tampón acuoso y/o la solución de almacenamiento puede tener un pH de menos de 7, tal como de pH 0 a pH 5, o de pH 1 a pH 3, y en determinados modos de realización, la solución tiene un pH de aproximadamente 2. La solución de almacenamiento también puede comprender una o más sales, tales como cloruro de magnesio o cloruro de sodio. En algunos ejemplos, la
- 15 concentración de la sal es de más de cero a 2 M, tal como de 0,25 M a aproximadamente 1,5 M, de 0,5 M a 1,25 M, o aproximadamente 1 M. En modos de realización ejemplares, la solución de almacenamiento de QMP comprende el QMP en una mezcla de DMSO y glicina 10 mM a pH 2, y con una concentración de cloruro de magnesio de hasta 1 M.
- 20 En algunos ejemplos, el ajuste de pH es una solución adecuada para ajustar el pH de una solución de un pH adecuado para el almacenamiento de un QMP a un pH adecuado para permitir un uso eficaz de un QMP en un ensayo de tinción y/o amplificación. El pH de almacenamiento puede ser de pH 0 a pH 5, y el pH adecuado para un uso eficaz del QMP puede ser de pH 8 a pH 12. En determinados modos de realización, el ajuste de pH comprende una solución Tris a aproximadamente pH 10, tal como una solución Tris 0,5 M, o una solución Tris a
- 25 aproximadamente pH 8, tal como una solución Tris 0,25 mM.

Las opciones ejemplares para la porción cromógena del kit incluyen, pero no se limitan a:

- 30 3 distribuidores - (i) QMP en disolvente orgánico al 100 %; (ii) ajuste de pH; (iii) cofactores enzimáticos;
- 3 distribuidores - (i) QMP en mezcla tampón acuoso/orgánico (tampón hasta un 100 %); (ii) ajuste de pH; (iii) cofactores enzimáticos; y
- 35 2 distribuidores - (i) QMP en mezcla tampón acuoso/orgánico (tampón hasta un 100 %) + cofactores enzimáticos; (ii) ajuste de pH.

Un experto en la técnica apreciará que en el kit, la enzima y los conjugados de anticuerpo se almacenan típicamente por separado para evitar reacciones no deseadas en almacenamiento.

## 40 VIII. Ejemplos

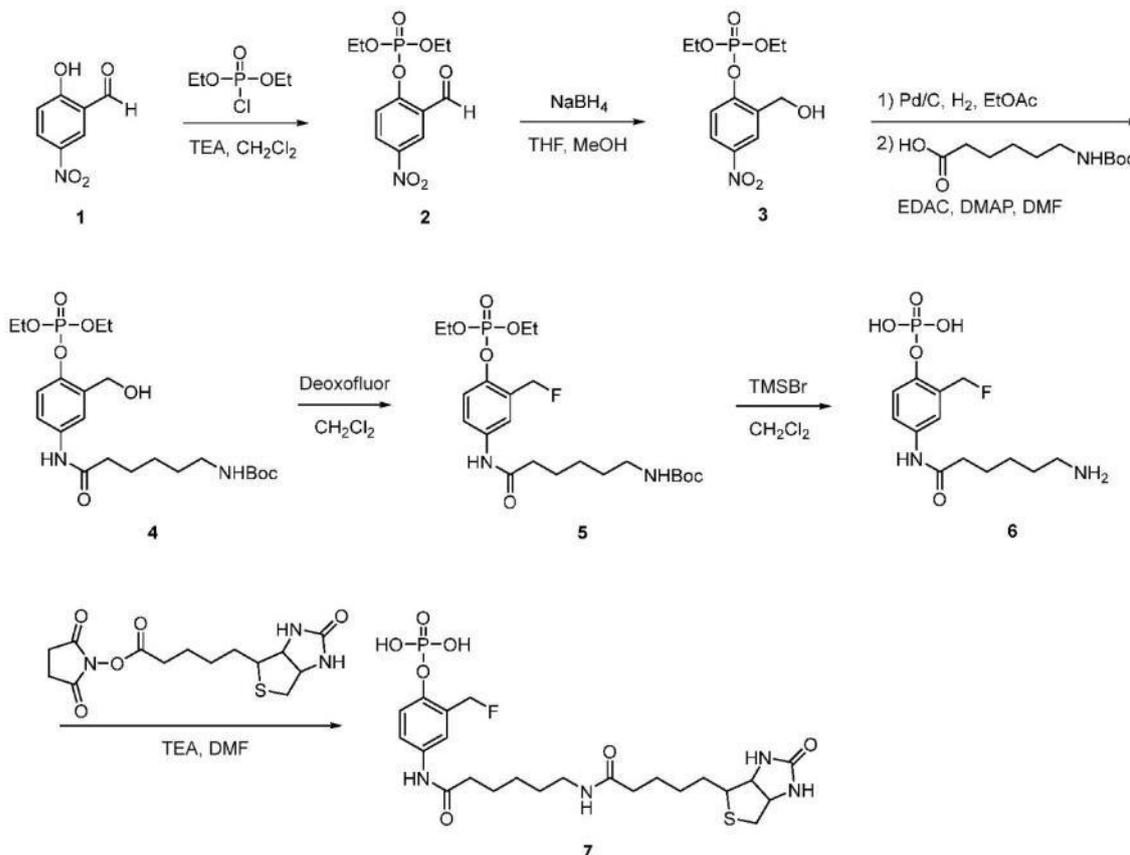
- Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinados rasgos específicos de modos de realización de trabajo y protocolos generales. El alcance de la presente invención no se limita a estos rasgos ejemplificados por los
- 45 siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

#### Síntesis y caracterización de QMP

- 50 **Materiales y procedimientos sintéticos.** Se recogieron datos de RMN en un espectrómetro Bruker 400 MHz Spectrometer en funcionamiento con Topspin (Bruker). Se referenciaron desplazamientos químicos con la resonancia de disolvente deuterado para  $^1\text{H}$  (7,26 ppm para  $\text{CDCl}_3$ , 2,50 ppm para  $\text{DMSO-d}_6$  y 3,31 ppm para  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y  $^{13}\text{C}$  (77,0 ppm para  $\text{CDCl}_3$ , 39,51 ppm para  $\text{DMSO-d}_6$ , y 49,15 ppm para  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Se referenciaron desplazamientos químicos con estándares externos para  $^{31}\text{P}$  (0 ppm para  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) y  $^{19}\text{F}$  (76,55 ppm para ácido trifluoroacético). Se obtuvieron datos de EM en un JEOL ESI-TOF (AccuTOF JMS-T100EC) en funcionamiento con
- 55 Mass Center (JEOL). Se realizó la HPLC prep en un Waters 2535 con columnas Waters Sunfire (Prep  $\text{C}_{18}$  OBD 10  $\mu\text{m}$  50 x 250 mm) en funcionamiento con Empower 3 (Waters). Se adquirieron todos los productos químicos de proveedores comerciales y se usaron como se recibieron a menos que se indicara de otro modo.

## Esquema 1



**Compuesto 2.** Se suspendió 5-nitrosalicaldehído (**1**) (10,0 g, 59,8 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) seguido de la adición de trietilamina (12,1 g, 120 mmol) y clorofosfato de dietilo (15,5 g, 89,7 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se extrajo la mezcla de reacción con 0,5 M HCl (100 ml), se recogió la capa orgánica y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida en dos lotes (hexanos : EtOAc) para dar el compuesto **2** como un aceite viscoso incoloro (15,4 g, rendimiento de un 85 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,37 (s, 1H), 8,70 (dd,  $J = 8,4$  Hz y 1,0 Hz, 1H), 8,42 (dd,  $J = 9,0$  Hz y 2,8 Hz, 1H), 7,69 (dd,  $J = 9,0$  Hz y 1,0 Hz, 1H), 4,28 (m, 4H), 1,37 (m, 6H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  186,2, 156,64, 156,58, 129,9, 127,5, 127,4, 124,5, 122,1, 122,0, 65,7, 65,6, 16,1, 16,0; EM (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_7\text{P}^+$  304,1, hallado 303,7.

**Compuesto 3.** Se disolvió el compuesto **2** (3,50 g, 11,5 mmol) en una mezcla de THF y MeOH (1:1, 40 ml) seguido de la adición de  $\text{NaBH}_4$  (655 mg, 17,3 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación se desactivó la reacción con HCl 0,5 M (40 ml) y se extrajo la solución resultante con EtOAc (3 x 100 ml). Se combinaron las capas orgánicas y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (hexanos : EtOAc) para dar el compuesto **3** como un aceite viscoso incoloro (2,55 g, rendimiento de un 73 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,39 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 8,13 (dd,  $J = 9,0$  Hz y 2,8 Hz, 1H), 7,38 (dd,  $J = 9,0$  Hz y 1,0 Hz, 1H), 4,73 (s, 2H), 4,24 (m, 4H), 1,37 (m, 6H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152,6, 152,5, 145,1, 134,6, 134,5, 125,3, 124,3, 121,1, 121,0, 65,65, 65,59, 59,3, 16,12, 16,06; EM (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_7\text{P}^+$  306,1, hallado 305,7.

**Compuesto 4.** Se disolvió el compuesto **3** (2,00 g, 6,55 mmol) en EtOAc (50 ml) en un matraz de fondo redondo seguido de la adición de Pd/C (200 mg). Se selló el matraz y se agitó en una atmósfera de  $\text{H}_2$  durante 16 horas, punto en el que se diluyó la mezcla de reacción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml). A continuación se añadió una punta de espátula de celite y se filtró la mezcla de reacción. Se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida para dar un aceite incoloro. Se disolvió el aceite en DME (20 ml) seguido de la adición de DMAP (80 mg, 0,655 mmol), EDAC (1,38 g, 7,21 mmol), y ácido *N*-boc-aminocaproico (1,67 g, 7,21 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas, seguido de desactivación con  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml). Se extrajo la emulsión resultante con EtOAc (3 x 100 ml), se combinaron las capas orgánicas y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (hexanos : EtOAc) para dar el compuesto **4** como un aceite viscoso incoloro

(2,08 g, rendimiento de un 65 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,90 (s, 1H), 7,64 (dd,  $J = 8,4$  Hz y 2,4 Hz, 1H), 7,40 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 7,04 (dd,  $J = 9,0$  Hz y 1,0 Hz, 1H), 4,84 (s. a., 1H), 4,55 (s, 2H), 4,41 (s. a., 1H), 4,16 (m, 4H), 3,02 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 2,27 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,44-1,40 (m, 11H), 1,38-1,32 (m, 8H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172,0, 156,1, 143,6, 143,5, 136,25, 133,01, 132,96, 121,3, 120,69, 120,67, 120,3, 79,0, 65,07, 65,01, 59,5, 40,3, 36,9, 29,6, 28,3, 26,2, 25,1, 16,0, 15,9; EM (ESI)  $m/z$  (M+H) $^+$  calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{P}^+$  511,2, hallado 510,5.

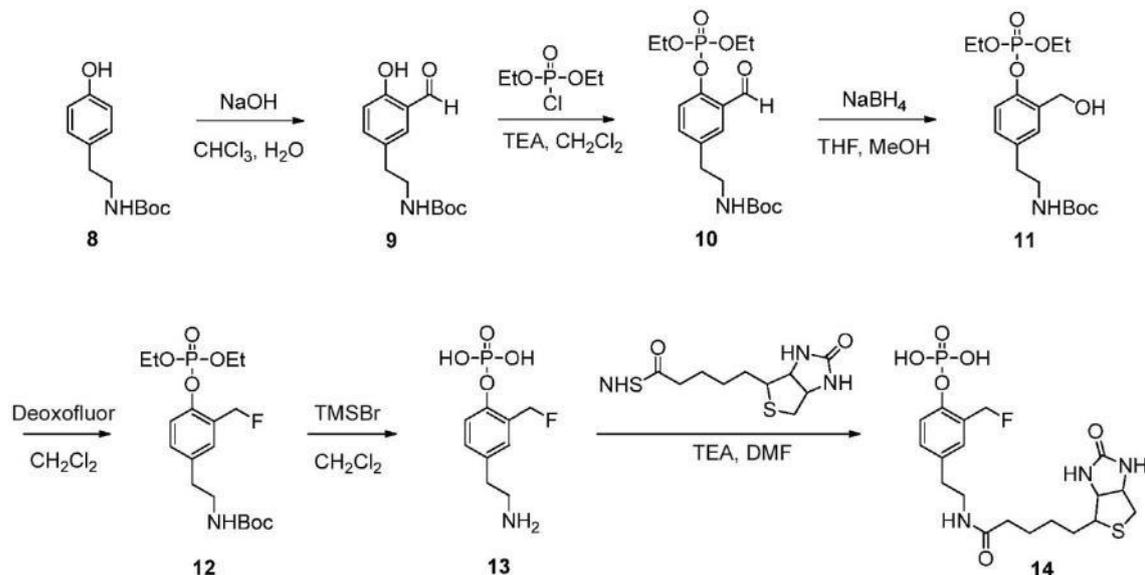
**Compuesto 5.** Se disolvió el compuesto **4** (600 mg, 1,23 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) en un frasco de centelleo sellado y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A continuación se añadió gota a gota Deoxo-fluor<sup>®</sup> (trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre, disponible de Sigma-Aldrich, 299 mg, 1,35 mmol) y se selló el recipiente de reacción. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 1 hora, seguido de desactivación con  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml). Se separó la capa orgánica y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O}$  : ACN) para dar el compuesto **5** como un aceite viscoso incoloro (420 mg, rendimiento de un 70 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,69 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,44 (dd,  $J = 9,0$  y 0,8 Hz, 1H), 7,19 (dd,  $J = 9,0$  Hz y 1,0 Hz, 1H), 5,38 (d,  $J = 76$  Hz, 2H), 4,71 (s. a., 1H), 4,18 (m, 4H), 3,06 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 2,29 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,47-1,41 (m, 11H), 1,35-1,31 (m, 8H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,8, 156,1, 144,06, 144,01, 143,99, 143,94, 135,8, 127,74, 127,67, 127,57, 127,50, 121,3, 120,92, 120,85, 120,06, 80,5, 78,9, 64,9, 64,8, 40,4, 36,9, 29,7, 28,3, 26,3, 25,0, 16,02, 15,95; EM (ESI)  $m/z$  (M+H) $^+$  calc. para  $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{FN}_2\text{O}_7\text{P}^+$  491,2, hallado 491,5.

**Compuesto 6.** Se disolvió el compuesto **5** (140 mg, 0,286 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml) seguido de la adición de bromuro de trimetilsililo (131 mg, 0,857 mmol) en un frasco de centelleo. Se selló el recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas, punto en el que se desactivó la reacción con MeOH (3 ml). Se retiraron los disolventes a presión reducida y se purificó directamente el residuo resultante por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O}$  : ACN) para dar el compuesto **6** como un sólido blanco (61 mg, rendimiento de un 64 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,68 (s, 1H), 7,52 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,31 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 5,49 (d,  $J = 48$  Hz, 2H), 2,94 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 2,42 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 1,78-1,66 (m, 4H), 1,51-1,43 (m, 2H); RMN de  $^{31}\text{P}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -4,83; RMN de  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -77,5. EM (ESI)  $m/z$  (M+H) $^+$  calc. para  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_5\text{P}^+$  335,1, hallado 334,7. El RMN de  $^{13}\text{C}$  no se determinó debido a la baja solubilidad y falta de señal.

#### Ejemplo de conjugación con el compuesto 6:

**Compuesto 7.** Se disolvió el compuesto **6** (50 mg, 0,15 mmol) en DMF (2 ml) en un frasco de centelleo, seguido de la adición de NHS-biotina (60 mg, 0,16 mmol) y trietilamina (76 mg, 0,75 mmol). Se selló el recipiente de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se purificó directamente la mezcla de reacción por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O}$  : ACN) para dar el compuesto **7** como un sólido blanco (46 mg, rendimiento de un 58 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,93 (s, 1H), 7,75 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,53 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,21 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 5,44 (d,  $J = 47,6$  Hz, 2H), 4,36 - 4,24 (m, 1H), 4,17 - 4,06 (m, 1H), 3,09 (q,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 3,02 (q,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 2,81 (dd,  $J = 12,4$ , 5,0 Hz, 1H), 2,57 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H), 2,28 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 2,03 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,67 - 1,18 (m, 12H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  171,8, 171,1, 162,7, 135,6, 120,7, 120,4, 119,7, 119,6, 80,5, 78,9, 61,0, 59,2, 55,4, 38,3, 36,2, 35,2, 29,0, 28,2, 28,0, 26,1, 25,3, 24,8. RMN de  $^{31}\text{P}$  (162 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  -5,21; RMN de  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  -76,57. EM (ESI)  $m/z$  (M-H) $^-$  calc. para  $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{FN}_4\text{O}_7\text{PS}^-$  559,2, hallado 559,0.

## Esquema 2



**Compuesto 9.** Se disolvió *N*-Boc-tiramina (10,0 g, 42,1 mmol) **8** en CHCl<sub>3</sub> (80 ml) seguido de la adición de H<sub>2</sub>O (40 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador de reflujo. A continuación se añadió NaOH en polvo (16,8 g, 421 mmol) y se calentó la mezcla de reacción hasta 60 °C en un baño de aceite con agitación enérgica. Después de 1 hora, se añadió una segunda porción de NaOH (8,4 g, 210 mmol) y se continuó con la agitación durante 1 hora adicional. Después de 1 hora, se añadió una tercera porción de NaOH (8,4 g, 210 mmol) y se continuó con la agitación durante 5 horas adicionales. A continuación se extrajo la mezcla de reacción con HCl 0,5 M, se recogió la capa orgánica y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (hexanos : EtOAc) para dar el compuesto **9** como un sólido blanquecino de bajo punto de fusión (5,43 g, rendimiento de un 49 %): RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,9 (s, 1H), 9,86 (s, 1H), 7,36 (d, *J* = 20 Hz, 2H), 6,94 (d, *J* = 20 Hz, 1H), 4,58 (s. a., 1H), 3,34 (s. a., 2H), 2,79 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,43 (s, 9H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196,5, 160,3, 155,9, 137,6, 133,4, 130,4, 120,5, 117,8, 79,4, 41,7, 35,1, 28,4; EM (ESI) *m/z* (*M*-H)<sup>-</sup> calc. para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub><sup>-</sup> 264,1, hallado 264,1.

**Compuesto 10.** Se disolvió el compuesto **9** (2,00 g, 7,54 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) seguido de la adición de trietilamina (1,53 g, 15,1 mmol) y clorofosfato de dietilo (1,95 g, 11,3 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación se extrajo la mezcla de reacción con HCl 0,5 M (50 ml), se recogió la capa orgánica y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (hexanos : EtOAc) para dar el compuesto **10** como un aceite viscoso incoloro (2,20 g, rendimiento de un 73 %): RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,3 (s, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,38-7,34 (m, 2H), 4,66 (s. a., 1H), 4,21 (m, 4H), 3,32 (s. a., 2H), 2,78 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,38-1,30 (m, 15H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188,4, 155,7, 151,4, 151,3, 136,5, 136,0, 128,6, 127,10, 127,04, 121,17, 121,14, 79,2, 65,03, 64,97, 41,4, 35,3, 28,3, 16,02, 15,95; EM (ESI) *m/z* (2*M*+Na)<sup>+</sup> calc. para C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>14</sub>P<sub>2</sub><sup>+</sup> 825,3, hallado 825,3.

**Compuesto 11.** Se disolvió el compuesto **10** (1,00 g, 2,49 mmol) en una mezcla de THF y MeOH (1:1, 10 ml) seguido de la adición de NaBH<sub>4</sub> (141 mg, 3,74 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación se desactivó la reacción con HCl 0,5 M (10 ml) y se extrajo la solución resultante con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 25 ml). Se combinaron las capas orgánicas y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (hexanos : EtOAc) para dar el compuesto **11** como un aceite viscoso incoloro (540 mg, rendimiento de un 53 %): RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,29 (s, 1H), 7,14 (s, 2H), 4,65 (s, 2H), 4,60 (s. a., 1H), 4,27 (m, 4H), 3,37 (s. a., 2H), 2,80 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,45 (s, 9H), 1,39 (t, *J* = 6,8 Hz, 6H); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,8, 146,9, 146,8, 136,8, 133,04, 133,00, 131,4, 129,5, 121,12, 121,10, 79,3, 65,13, 65,07, 60,2, 41,6, 35,5, 28,4, 16,11, 16,04; EM (ESI) *m/z* (*M*+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub>P<sup>+</sup> 404,2, hallado 404,2.

**Compuesto 12.** Se disolvió el compuesto **11** (250 mg, 0,620 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) en un frasco de centelleo sellado y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A continuación se añadió gota a gota Deoxo-fluor<sup>®</sup> (trifluoruro de bis(2-metoxietil)aminoazufre, disponible de Sigma-Aldrich, 151 mg, 0,682 mmol) y se selló el recipiente de reacción. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 15 minutos, seguido de desactivación con H<sub>2</sub>O (5 ml). Se separó la capa orgánica y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en H<sub>2</sub>O : ACN) para dar el

compuesto **12** como un aceite viscoso incoloro (110 mg, rendimiento de un 44 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,30-7,25 (m, 2H), 7,15 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 5,45 (d,  $J = 48$  Hz, 2H), 4,70 (s. a., 1H), 4,25-4,17 (m, 4H), 3,34 (s. a., 2H), 2,78 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,42 (s, 9H), 1,34 (t,  $J = 6,8$  Hz, 6H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155,8, 146,91, 146,86, 146,84, 146,79, 136,0, 130,3, 129,7, 129,6, 127,6, 127,5, 127,4, 127,3, 119,9, 80,5, 79,2, 78,8, 64,82, 64,76, 41,6, 35,3, 28,2, 16,0, 15,9; EM (ESI)  $m/z$  (M+H) $^+$  calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{FNO}_6\text{P}^+$  406,2, hallado 405,7.

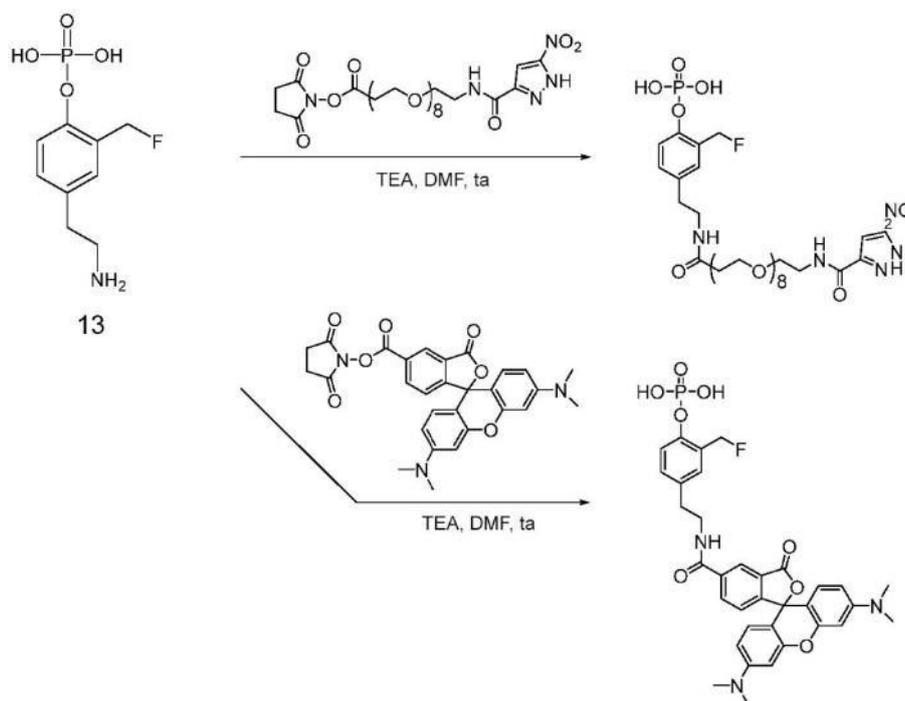
**Compuesto 13.** Se disolvió el compuesto **12** (110 mg, 0,247 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 ml) seguido de la adición de bromuro de trimetilsililo (TMSB) (113 mg, 0,740 mmol) en un frasco de centelleo. Se selló el recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas, punto en el que se desactivó la reacción con MeOH (1 ml). Se retiraron los disolventes a presión reducida y se purificó directamente el residuo resultante por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O} : \text{ACN}$ ) para dar el compuesto **13** como un sólido blanco (45 mg, rendimiento de un 72 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7,25 (d,  $J = 9,6$  Hz, 2H), 7,17 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 5,38 (d,  $J = 48$  Hz, 2H), 3,00 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 2,83 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H); RMN de  $^{31}\text{P}$  (162 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  0,22; RMN de  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  -75,6. EM (ESI)  $m/z$  (M-H) $^-$  calc. para  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{FNO}_4\text{P}^-$  248,0, hallado 248,0. El RMN de  $^{13}\text{C}$  no se determinó debido a la baja solubilidad y falta de señal.

### Ejemplo de conjugación de marcador detectable con el compuesto 13:

**Compuesto 14.** Se disolvió el compuesto **13** (15 mg, 0,060 mmol) en DMF (2 ml) en un frasco de centelleo, seguido de la adición de NHS-biotina (23 mg, 0,066 mmol) y trietilamina (18 mg, 0,18 mmol). Se selló el recipiente de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se purificó directamente la mezcla de reacción por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O} : \text{ACN}$ ) para dar el compuesto **14** como un sólido blanco (25 mg, rendimiento de un 86 %): RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,33-7,21 (m, 3H), 5,42 (d,  $J = 48$  Hz, 2H), 4,52-4,49 (m, 1H), 4,31-4,28 (m, 1H), 3,43-3,40 (m, 2H), 3,19-3,17 (m, 1H), 2,96-2,92 (m, 1H), 2,83-2,79 (m, 2H), 2,72 (d,  $J = 13$  Hz, 1H), 2,15 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,71-1,57 (m, 4H), 1,48-1,38 (m, 2H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  176,3, 166,3, 149,15, 149,09, 149,04, 137,4, 131,4, 130,9, 130,8, 129,7, 129,6, 129,5, 129,4, 121,5, 81,8, 80,1, 63,6, 61,8, 57,1, 41,8, 41,2, 36,9, 35,8, 29,8, 29,6, 27,1; RMN de  $^{31}\text{P}$  (162 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -5,12; RMN de  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -77,3. EM (ESI)  $m/z$  (M-H) $^-$  calc. para  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_6\text{PS}^-$  474,1, hallado 474,0.

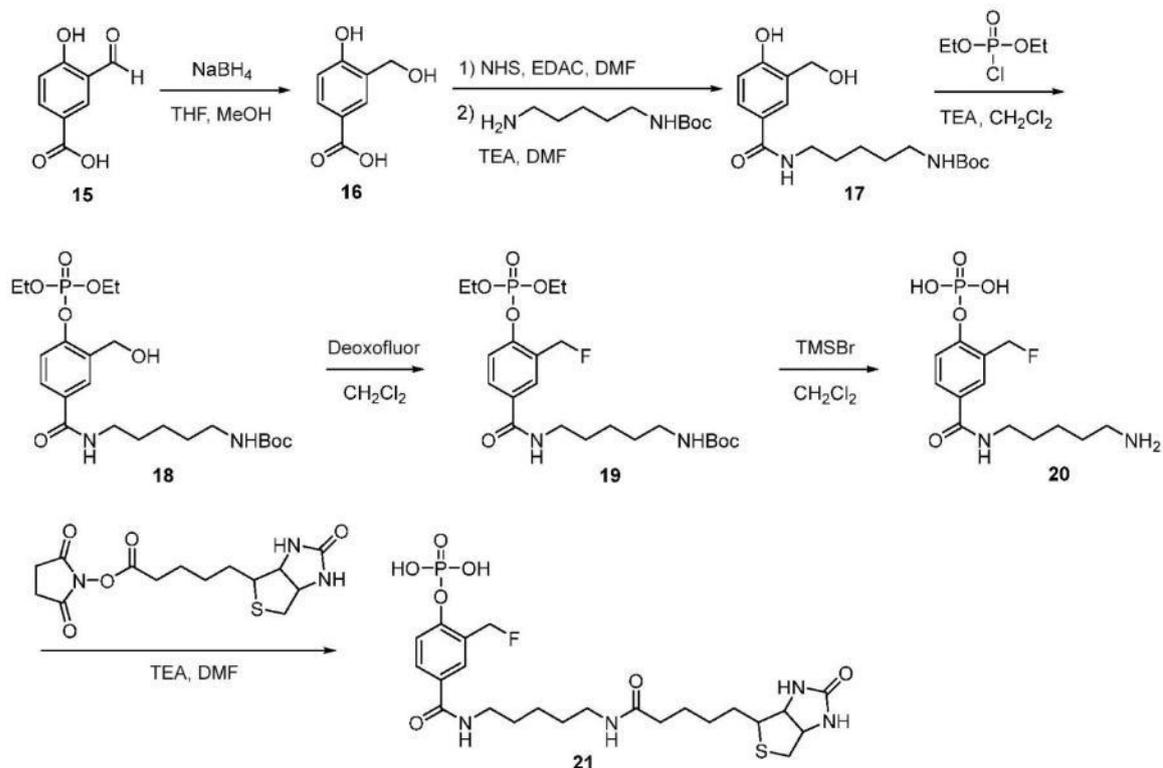
Los ejemplos adicionales de conjugación de marcador detectable con el compuesto 13 se muestran en el esquema 3.

### Esquema 3



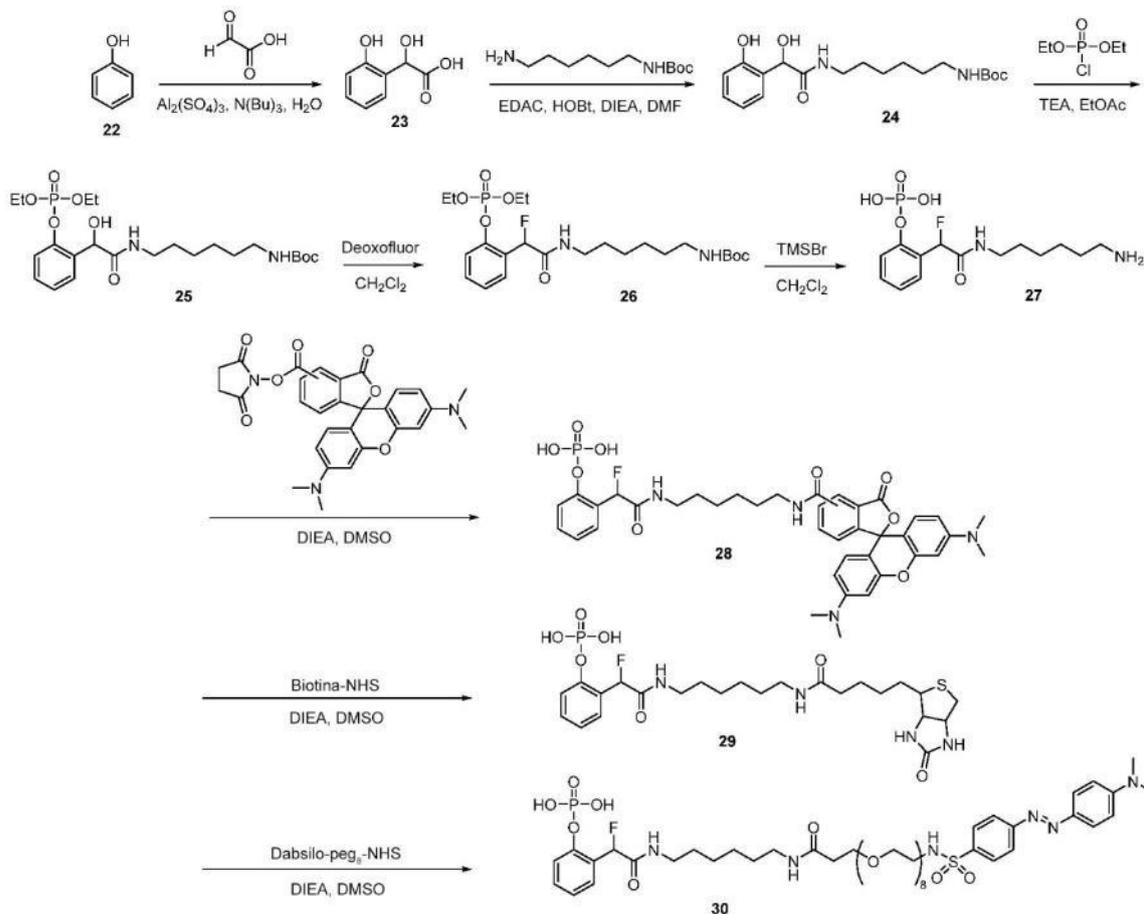
Se pueden sintetizar QMP adicionales de acuerdo con los esquemas 4-10.

## Esquema 4



Se trata el compuesto 15 con borohidruro de sodio en THF y metanol para formar el compuesto 16. A continuación, se trata el compuesto 16 en primer lugar con N-hidroxisuccinimida en presencia de un agente de reticulación de carbodiimida tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), en DMF para formar un ácido activado (no mostrado). A continuación se hace reaccionar el ácido activado con 1-BOC-pentanodiamina en DMF y en presencia de una base tal como trietilamina, para formar el compuesto 17. A continuación se hace reaccionar el compuesto 17 con clorofosfato de dietilo y trietilamina en diclorometano para formar el compuesto 18, por el procedimiento usado para preparar el compuesto 10 en el esquema 2, anterior. A continuación se hace reaccionar el compuesto 18 con Deoxo-fluor<sup>®</sup> en diclorometano para formar el compuesto 19, que a su vez, se hace reaccionar con bromuro de trimetilsililo (TMSB) para formar el compuesto de amina desprotegida 20. A continuación se conjuga el compuesto 20 con biotina para formar el compuesto 21. Los procedimientos para preparar los compuestos 19, 20 y 21 son los mismos que los usados para los compuestos 12, 13 y 14 en el esquema 2, anterior.

## Esquema 5



5 **Compuesto 23.** Se combinaron fenol (**22**) (75,3 g, 800 mmol), ácido glioxílico monohidratado (9,21 g, 100 mmol), tributilamina (17,6 g, 22,6 ml, 95 mmol),  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  (3,33 g, 5 mmol) y  $\text{H}_2\text{O}$  (4 ml) en un matraz de fondo redondo y se calentó la mezcla de reacción hasta  $50^\circ\text{C}$  durante 8 horas. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente seguido de la adición de  $\text{NaOH}$  1 M (100 ml) y extracción con 1,2-dicloroetano (3 x 100 ml). A continuación, se acidificó la capa de  $\text{NaOH}$  hasta  $\text{pH} = 2$  por adición con cuidado de  $\text{HCl}$  conc. Se extrajo la solución resultante con  $\text{EtOAc}$  (5 x 200 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . A continuación se retiraron los disolventes a presión reducida, dando el compuesto **23** como un aceite marrón claro viscoso (13,4 g, rendimiento de un 80 %).

15 **Compuesto 24.** Se disolvieron el compuesto **23** (12,0 g, 71,4 mmol) y *N*-boc-diaminohexano (23,2 g, 107 mmol) en DMF (125 ml) seguido de adición secuencial de HOBt (965 mg, 7,14 mmol), EDAC (20,5 g, 107 mmol) y finalmente DIEA (13,8 g, 18,6 ml, 107 mmol). Se agitó la mezcla de reacción en  $\text{N}_2$  durante 16 horas, seguido de reducción del DMF a aproximadamente 25 ml a presión reducida. A continuación se desactivó la mezcla resultante con  $\text{HCl}$  1 M (100 ml) y se extrajo con  $\text{EtOAc}$  (3 x 100 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida en tres porciones iguales y separadas (Biotage Snap 50; hex:EA 1:0 a 5:95) para dar el compuesto **24** como un aceite viscoso incoloro (16,0 g, rendimiento de un 61 %). EM (ESI)  $m/z$  ( $M+2\text{H-boc}$ )<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3$ <sup>+</sup> 267,2, hallado 266,6.

25 **Compuesto 25.** Se disolvió el compuesto **24** (13,0 g, 35,5 mmol) en  $\text{EtOAc}$  (25 ml) y se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$  en un baño de hielo en  $\text{N}_2$ . A continuación se añadió trietilamina (10,8 g, 14,8 ml, 107 mmol) y se dejó agitar durante 10 minutos. A continuación se añadió gota a gota clorofosfato de dietilo (6,73 g, 7,69 ml, 39,0 mmol) durante un periodo de 5 minutos. Se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo y se agitó en  $\text{N}_2$  durante 4 horas. A continuación se desactivó la mezcla de reacción con  $\text{HCl}$  1 M (200 ml) y se extrajo con  $\text{EtOAc}$  (3 x 200 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 340; hex:EA 1:0 a 5:95) para dar el compuesto **25** como un aceite viscoso incoloro (16,2 g, rendimiento de un 91 %). EM (ESI)  $m/z$  ( $M+\text{H}$ )<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_8\text{P}$ <sup>+</sup> 503,5, hallado 503,2.

30 **Compuesto 26.** Se disolvió el compuesto **25** (13,0 g, 25,9 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (100 ml) seguido de enfriamiento

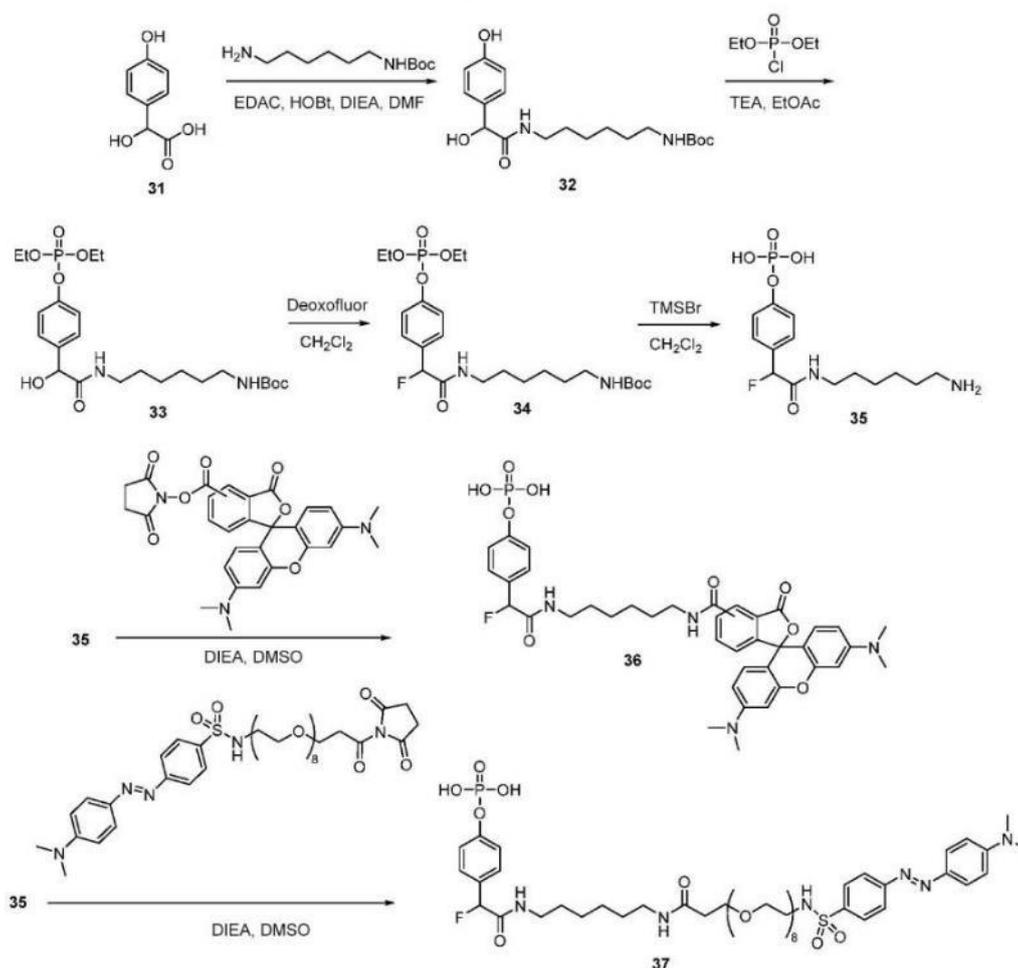
hasta  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un baño de hielo en  $\text{N}_2$ . A continuación se añadió gota a gota Deoxo-fluor<sup>®</sup> (6,02 g, 5,01 ml, 27,2 mmol) durante un período de 15 minutos. Se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo y se agitó en  $\text{N}_2$  durante 1 hora. A continuación se desactivó la mezcla de reacción con una solución de  $\text{NaHCO}_3$  saturado seguido de extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 100 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ . Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 340;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 1:0 a 92:8) para dar el compuesto **26** como un aceite viscoso amarillo claro (11,5 g, rendimiento de un 85 %). EM (ESI) m/z ( $\text{M}+2\text{H}-\text{boc}$ )<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{FN}_2\text{O}_5\text{P}^+$  405,2, hallado 405,0.

**Compuesto 27.** Se disolvió el compuesto **26** (11,0 g, 21,8 mmol) en  $\text{CHCl}_3$  seco (20 ml) seguido de enfriamiento hasta  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un baño de hielo en  $\text{N}_2$ . A continuación se añadió gota a gota TMSBr (16,7 g, 14,3 ml, 109 mmol) durante un período de 10 minutos. A continuación se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo y se agitó en  $\text{N}_2$  durante 16 horas. Se desactivó la mezcla de reacción con MeOH (50 ml) y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo en cinco porciones iguales usando RP-HPLC prep ( $\text{C}_{18}$ , 50 x 250 mm, 40 ml/minuto, TFA al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O}$  :  $\text{CH}_3\text{CN}$  99:1 a 5:95 durante 40 minutos) para dar el compuesto **27** como un sólido blanco (4,20 g, rendimiento de un 55 %). EM (ESI) m/z ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{FN}_2\text{O}_5\text{P}^+$  349,3, hallado 348,9.

**Ejemplo de conjugación con el compuesto 27: Compuesto 28.** Se disolvió 5(6)-carboxitetrametilrodamina (500 mg, 1,16 mmol) en DMSO seco (5 ml) seguido de la adición de DMAP (213 mg, 1,74 mmol) y carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (327 mg, 1,28 mmol). Se selló el recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se añadió el compuesto **27** (446 mg, 1,28 mmol), seguido de la adición de DIEA (750 mg, 1,01 ml, 5,80 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con MeOH (5 ml) y se purificó por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN 99:1 a 5:95 durante 40 minutos) para dar el compuesto **28** como un sólido morado oscuro (625 mg, rendimiento de un 71 %). EM (ESI) m/z ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> calc. para  $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{FN}_4\text{O}_9\text{P}^+$  761,3, hallado 761,3.

Se prepara el **compuesto 29** por el mismo procedimiento que el compuesto **21**, y se prepara el compuesto **30** por el mismo procedimiento que el compuesto **37**, a continuación.

## Esquema 6



**Compuesto 32.** Se disolvieron ácido 4-hidroximandélico (**31**) (11,0 g, 59,1 mmol) y *N*-*boc*-diaminohexano (14,1 g, 65,0 mmol) en DMF (125 ml) seguido de adición secuencial de HOBt (800 mg, 5,91 mmol), EDAC (17,0 g, 88,7 mmol) y finalmente DIEA (11,5 g, 15,4 ml, 88,7 mmol). Se agitó la mezcla de reacción en N<sub>2</sub> durante 16 horas, seguido de reducción del DMF a aproximadamente 25 ml a presión reducida. A continuación se desactivó la mezcla resultante con HCl 1 M (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida en tres porciones iguales y separadas (Biotage Snap 50; hex:EA 1:0 a 5:95) para dar el compuesto **32** como un aceite viscoso incoloro (18,7 g, rendimiento de un 86 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,28 (s, 1H), 7,07 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 6,81 (s. a., 1H), 6,64 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 4,87 (s, 1H), 4,78 (s. a., 1H), 4,57 (s. a., 1H), 3,23-3,11 (m, 2H), 2,99-2,97 (m, 2H), 1,42-1,35 (m, 13H), 1,18 (s. a., 4H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173,4, 162,7, 157,0, 128,2, 115,8, 79,4, 73,8, 40,34, 39,2, 36,5, 31,5, 29,7, 29,2, 28,4, 26,2, 26,1. EM (ESI) *m/z* (M+2H-*boc*)<sup>+</sup> calc. para C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 267,2, hallado 266,6.

**Compuesto 33.** Se disolvió el compuesto **32** (18,5 g, 50,5 mmol) en EtOAc (25 ml) y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo en N<sub>2</sub>. A continuación se añadió trietilamina (25,6 g, 35,2 ml, 253 mmol) y se dejó agitar durante 10 minutos. A continuación se añadió gota a gota clorofosfato de dietilo (9,15 g, 7,69 ml, 53,0 mmol) durante un período de 5 minutos. Se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo y se agitó en N<sub>2</sub> durante 4 horas. A continuación se desactivó la mezcla de reacción con HCl 1 M (200 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 200 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 340; hex:EA 1:0 a 5:95) para dar el compuesto **33** como un aceite viscoso incoloro (22,6 g, rendimiento de un 89 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,36 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,14 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 6,66 (s. a., 1H), 4,85 (s, 1H), 4,64 (s. a., 2H), 4,20-4,13 (m, 4H), 3,24-3,20 (m, 2H), 3,08-3,03 (m, 2H), 1,40-1,25 (m, 23H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172,1, 156,1, 150,5, 150,4, 136,9, 128,1, 120,04, 119,99, 79,1, 73,2, 64,8, 64,71, 64,65, 40,1, 39,1, 29,8, 29,2, 28,4, 26,04, 25,98, 16,07, 16,00; RMN de <sup>31</sup>P (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -5,9. EM (ESI) *m/z* (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>23</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P<sup>+</sup> 503,5, hallado 503,2.

**Compuesto 34.** Se disolvió el compuesto **33** (21,5 g, 42,3 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (100 ml) seguido de enfriamiento hasta 0 °C en un baño de hielo en N<sub>2</sub>. A continuación se añadió gota a gota Deoxo-fluor<sup>®</sup> (10,4 g, 8,68 ml, 47,1 mmol) durante un período de 15 minutos. Se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo y se agitó en N<sub>2</sub> durante 1 hora. A continuación se desactivó la mezcla de reacción con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> seguido de extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 340; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 1:0 a 92:8) para dar el compuesto **34** como un aceite viscoso amarillo claro (14,9 g, rendimiento de un 69 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,36 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,17 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 6,81 (s. a., 1H), 5,67 (d, 2H, *J* = 48 Hz), 4,73 (s. a., 1H), 4,20-4,10 (m, 4H), 3,26-3,20 (m, 2H), 3,05-2,98 (m, 2H), 1,50-1,20 (m, 23H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168,2, 168,0, 155,9, 151,28, 151,25, 151,21, 151,18, 131,7, 131,5, 128,03, 127,97, 119,95, 119,90, 91,9, 90,0, 78,7, 64,55, 64,48, 40,1, 38,7, 29,7, 29,1, 28,2, 26,07, 25,98, 15,90, 15,83; RMN de <sup>19</sup>F (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -175,5; RMN de <sup>31</sup>P (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -6,0. EM (ESI) *m/z* (M+2H-*boc*)<sup>+</sup> calc. para C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P<sup>+</sup> 405,2, hallado 405,0.

**Compuesto 35.** Se disolvió el compuesto **34** (3,20 g, 6,34 mmol) en CHCl<sub>3</sub> seco (20 ml) seguido de enfriamiento hasta 0 °C en un baño de hielo en N<sub>2</sub>. A continuación se añadió gota a gota TMSBr (4,85 g, 4,19 ml, 31,7 mmol) durante un período de 10 minutos. A continuación se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo y se agitó en N<sub>2</sub> durante 16 horas. Se desactivó la mezcla de reacción con MeOH (20 ml) y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se tomó el residuo en MeOH (10 ml) y se añadió gota a gota la mezcla resultante a un matraz de agitación de agua helada (100 ml), dando como resultado un precipitado blanco espeso. Se recogió el sólido por filtración a vacío y se lavó con agua fría. Se secó el sólido blanco resultante en alto vacío para dar el compuesto **35** como un sólido blanco (1,50 g, rendimiento de un 68 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,32 (t, 1H, *J* = 5,4 Hz), 8,17 (s. a., 3H), 7,36 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,16 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 5,72 (d, 2H, *J* = 48 Hz), 3,13-3,07 (m, 2H), 2,29 (s. a., 2H), 1,35-1,20 (m, 4H), 1,05-1,00 (m, 2H), 0,90-0,84 (m, 2H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168,3, 168,1, 154,7, 129,6, 129,4, 127,23, 127,18, 91,4, 89,6, 38,3, 37,1, 28,6, 26,9, 25,5, 24,9; RMN de <sup>19</sup>F (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -174,2; RMN de <sup>31</sup>P (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -4,8. EM (ESI) *m/z* (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>P<sup>+</sup> 349,3, hallado 348,9.

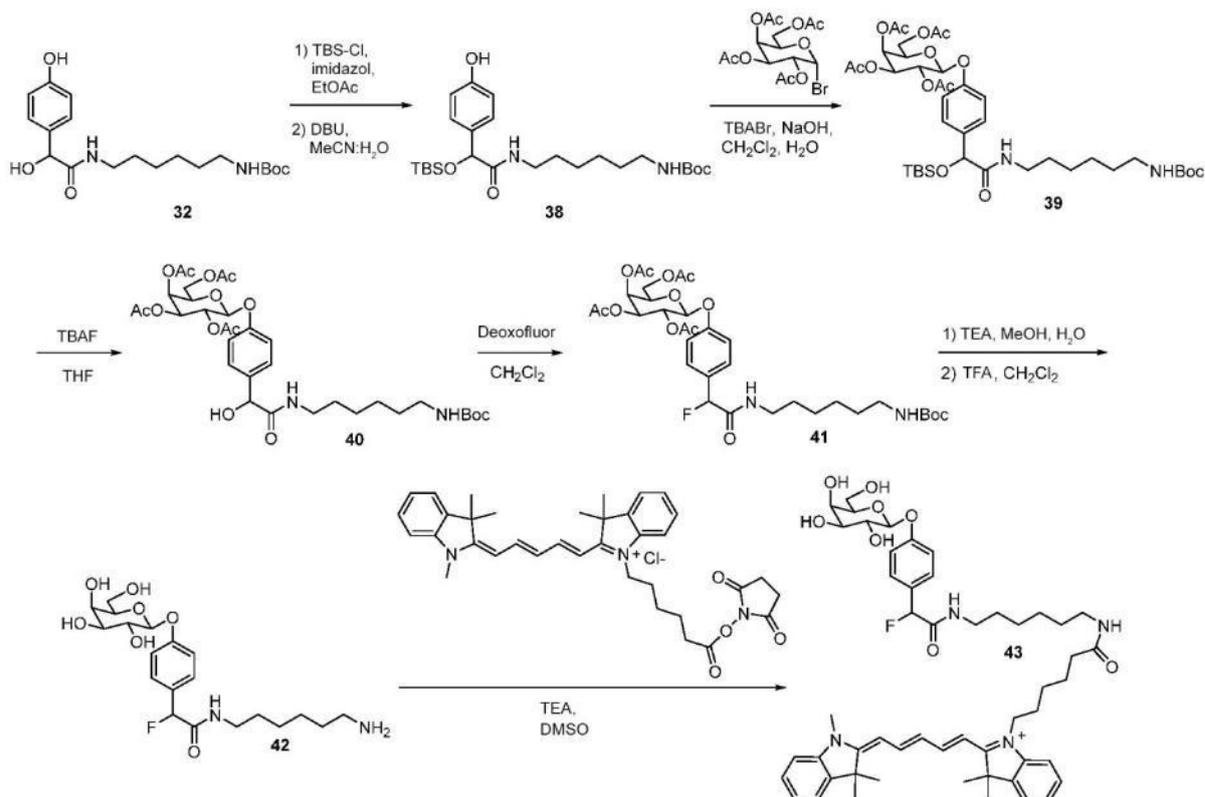
**Ejemplos de conjugación con el compuesto 35: Compuesto 36.** Se disolvió 5(6)-carboxitetrametilrodamina (500 mg, 1,16 mmol) en DMSO seco (5 ml) seguido de la adición de DMAP (213 mg, 1,74 mmol) y carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (327 mg, 1,28 mmol). Se selló el recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se añadió el compuesto **35** (446 mg, 1,28 mmol), seguido de la adición de DIEA (750 mg, 1,01 ml, 5,80 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con MeOH (5 ml) y se purificó por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en H<sub>2</sub>O:ACN 99:1 a 5:95 durante 40 minutos) para dar el compuesto **36** como un sólido morado oscuro (625 mg, rendimiento de un 71 %). EM (ESI) *m/z* (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>39</sub>H<sub>43</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sup>+</sup> 761,3, hallado 761,3.

**Compuesto 37.** Se añadió ácido amino-peg<sub>8</sub> (511 mg, 1,16 mmol) a una solución de DMSO seco (10 ml) y DIEA (449 mg, 605 μl, 3,47 mmol) seguido de sonicación hasta que se observó una solución transparente. A continuación se añadió cloruro de dabsilo (750 mg, 2,32 mmol) en diez porciones iguales durante 15 minutos. Se selló el

recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se añadió DMAP (212 mg, 1,74 mmol), seguido de la adición de carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (327 mg, 1,28 mmol) en diez porciones iguales durante 15 minutos. Se selló el recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añadió el compuesto **35** (446 mg, 1,28 mmol), seguido de la adición de DIEA (750 mg, 1,01 ml, 5,80 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con MeOH (5 ml) y se purificó por RP-HPLC prep (0,05 % TFA en H<sub>2</sub>O:ACN 99:1 a 5:95 durante 40 minutos) para dar el compuesto **37** como un aceite viscoso naranja oscuro (735 mg, rendimiento de un 60 % basado en ácido amino-peg<sub>8</sub>). EM (ESI) *m/z* (M+2H)<sup>2+</sup> calc. para C<sub>47</sub>H<sub>74</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>16</sub>PS<sup>2+</sup> 530,2, hallado 530,3.

10

## Esquema 7



**Compuesto 38.** Se disolvió el compuesto **32** (4,49 g, 12,3 mmol) en EtOAc (25 ml) seguido de la adición de imidazol (2,08 g, 30,6 mmol) y TBS-Cl (4,61 g, 30,6 mmol). Se selló el recipiente de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación se retiró el disolvente a presión reducida y se tomó el residuo resultante en una mezcla de MeCN:H<sub>2</sub>O (10:1, 20 ml). A continuación se añadió DBU (1,87 g, 12,3 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. A continuación se extrajo la mezcla de reacción con EtOAc (50 ml) y HCl 1 M (3 x 50 ml). Se recogió la capa orgánica, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se retiró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 50; hex:EA 1:0 a 1:4) para dar el compuesto **38** como un aceite incoloro (5,10 g, rendimiento de un 86 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,89 (s. a., 1H), 7,06 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 7,01 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz), 6,54 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz), 4,95 (s, 1H), 4,62 (s. a., 1H), 3,30-3,20 (m, 2H), 3,09-3,01 (m, 2H), 1,55-1,46 (m, 13H), 1,28 (s, 4H), 0,88 (s, 9H), 0,05 (s, 3H), -0,12 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173,3, 156,7, 130,5, 127,6, 115,6, 79,2, 75,6, 40,4, 38,8, 29,9, 29,5, 28,4, 26,3, 25,7, 18,1, -4,7, -5,3. EM (ESI) *m/z* (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>25</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Si<sup>+</sup> 481,3, hallado 481,3.

15

20

25

**Compuesto 39.** Se combinaron el compuesto **38** (1,75 g, 3,64 mmol), TBABr (2,35 g, 7,28 mmol) y acetobromo- $\alpha$ -D-galactósido (2,99 g, 7,28 mmol) en un matraz de fondo redondo y se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml). A continuación se añadió una solución acuosa de NaOH (5 % en peso, 12 ml) y se agitó la mezcla de reacción enérgicamente a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación se diluyó la mezcla de reacción con salmuera (50 ml) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 ml). Se recogió la capa orgánica, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se retiró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 50; hex:EA 1:0 a 1:4) para dar el compuesto **39** como un aceite incoloro (2,45 g, rendimiento de un 83 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,34 (dd, 2H, *J* = 8,8 Hz y 2,0 Hz), 6,93 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz), 6,82-6,78 (m, 1H), 5,49-5,41 (m, 2H), 5,06 (dd, 1H, *J* = 14 Hz y 3,6 Hz), 5,03-5,00 (m, 2H), 4,55 (s. a., 1H), 4,25-4,00 (m, 3H), 3,33-3,25 (m, 1H), 3,17-3,02 (m, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,04 (s, 6H), 1,99 (s, 3H), 1,50-1,40 (m, 13H), 1,29 (s. a., 4H), 0,91 (s, 9H), 0,06 (s, 3H), -0,06 (s, 3H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 171,9, 170,3, 170,2, 170,0, 169,3, 156,66, 156,64, 155,9, 134,86, 136,84, 127,34, 127,28, 116,7,

35

99,60, 99,57, 79,0, 75,1, 75,0, 70,92, 70,89, 70,8, 68,6, 66,8, 61,3, 40,3, 38,7, 29,9, 29,5, 28,4, 26,4, 26,3, 25,7, 20,7, 20,6, 20,5, 18,1, -4,8, -5,4. EM (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>39</sub>H<sub>63</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>Si<sup>+</sup> 811,4, hallado 811,7.

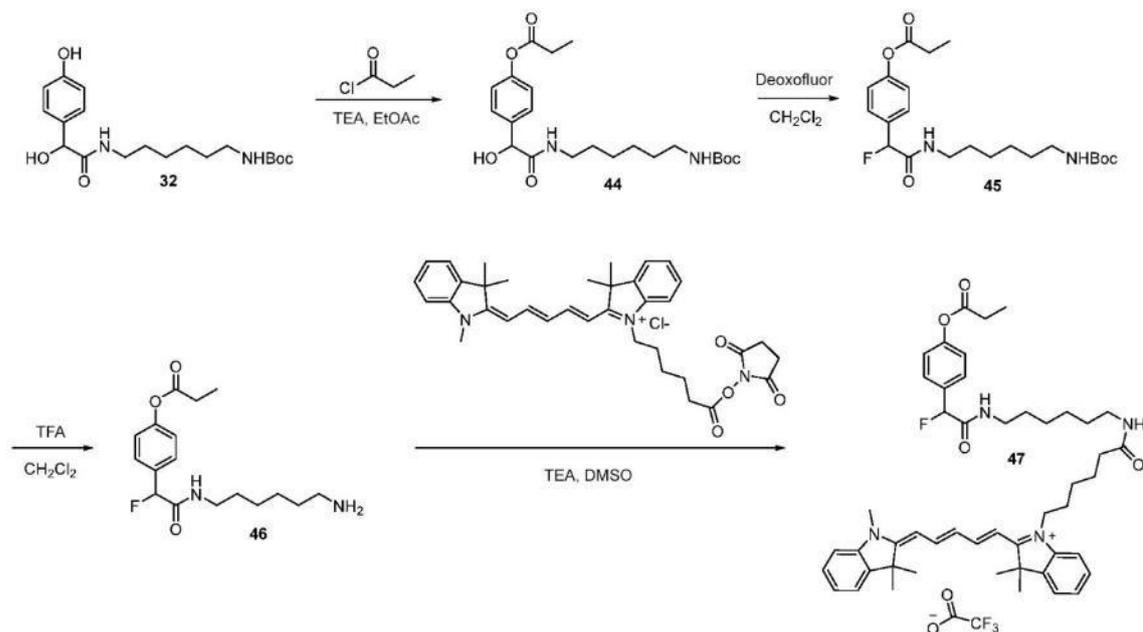
5 **Compuesto 40.** Se disolvió el compuesto **39** (2,15 g, 2,65 mmol) en THE (20 ml) seguido de purgado con N<sub>2</sub> y enfriamiento hasta 0 °C en un baño de hielo. A continuación se añadió gota a gota TBAF (1 M en THF, 2,65 ml, 2,65 mmol) durante un período de 5 minutos. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C en N<sub>2</sub> durante 15 minutos, seguido de desactivación con una solución de NaHCO<sub>3</sub> saturado (25 ml). Se extrajo la suspensión resultante con EtOAc (3 x 50 ml). Se combinaron las capas orgánicas, secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se retiró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 50; hex:EA 1:0 a 1:9) para  
10 dar el compuesto **40** como un aceite incoloro que se volvió una espuma blanca tras exposición a alto vacío (1,55 g, rendimiento de un 84 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,35 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 6,99 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 6,36 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 5,50-5,43 (m, 2H), 5,10 (dd, 1H, J = 10 Hz y 3,2 Hz), 5,05-4,98 (m, 2H), 4,57 (s. a., 1H), 4,25-4,02 (m, 3H), 4,04 (s. a., 1H), 3,30-3,20 (m, 2H), 3,21-3,03 (m, 2H), 2,18 (s, 3H), 2,05-2,00 (m, 9H), 1,53-1,33 (m, 13H), 1,32-1,20 (m, 4H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172,1, 170,4, 170,2, 170,1, 169,4, 157,0, 156,1, 134,65, 134,63,  
15 128,2, 117,2, 117,1, 99,62, 99,60, 79,2, 73,53, 73,49, 71,0, 70,8, 68,6, 66,8, 61,3, 40,0, 39,2, 29,8, 28,4, 25,9, 20,70, 20,65, 20,64, 20,56. EM (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>33</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub><sup>+</sup> 697,3, hallado 697,5.

**Compuesto 41.** Se disolvió el compuesto **40** (1,22 g, 1,75 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20 ml) seguido de enfriamiento hasta 0 °C en un baño de hielo en N<sub>2</sub>. A continuación se añadió gota a gota Deoxo-fluor<sup>®</sup> (426 mg, 355 µl, 1,93 mmol) durante un período de 5 minutos. Se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo y se agitó en N<sub>2</sub> durante 15 minutos. A continuación se desactivó la mezcla de reacción con una solución de NaHCO<sub>3</sub> saturado (20 ml) seguido de extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 ml). Se recogieron las capas orgánicas, se combinaron y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se retiró el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (Biotage Snap 50; hex:EA 1:0 a 1:9) para dar el compuesto **41** como un aceite incoloro que se volvió una  
20 espuma blanca tras exposición a alto vacío (840 mg, rendimiento de un 69 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,35 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 6,99 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 6,63 (s. a., 1H), 5,69 (d, 1H, J = 5,6 Hz), 5,50-5,41 (m, 2H), 5,08 (dd, 1H, J = 10 Hz y 3,6 Hz), 5,03 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 4,58 (s. a., 1H), 4,23-4,01 (m, 3H), 4,04 (s. a., 1H), 3,30-3,23 (m, 2H), 3,12-3,01 (m, 2H), 2,16 (s, 3H), 2,02-1,96 (m, 9H), 1,58-1,25 (m, 17H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,3, 170,1, 170,0, 169,3, 168,4, 168,2, 162,4, 157,62, 157,60, 157,57, 156,0, 129,94, 129,91, 129,75, 129,72, 128,31,  
25 128,24, 128,18, 116,90, 116,89, 99,3, 92,27, 92,23, 90,40, 90,37, 79,0, 70,99, 70,98, 70,7, 68,5, 66,8, 61,3, 40,2, 38,9, 36,4, 31,2, 29,9, 29,3, 28,3, 26,2, 26,1, 20,62, 20,57, 20,48; RMN de <sup>19</sup>F (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -175,2, -175,6. EM (ESI) m/z (M+Na)<sup>+</sup> calc. para C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>FN<sub>2</sub>NaO<sub>13</sub><sup>+</sup> 721,3, hallado 721,2.

**Compuesto 42.** Se disolvió el compuesto **41** (300 mg, 0,429 mmol) en una mezcla de TEA:MeOH:H<sub>2</sub>O (1:8:1, 2 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se retiraron los disolventes a presión reducida seguido de la adición de una solución de TFA:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 5 ml). Se selló el recipiente de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiraron los disolventes a presión reducida y se purificó el residuo resultante por RP-HPLC prep. (TFA al 0,05 % en H<sub>2</sub>O:ACN 99:1 a 5:95 durante 60 minutos) para dar el compuesto **42** como un sólido blanco (75 mg, rendimiento de un 41 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,43 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 7,67 (s. a., 3H),  
35 7,35 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,05 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 5,77 (d, 1H, J = 48 Hz), 5,18 (s, 1H), 4,95-4,80 (m, 2H), 4,67 (s, 1H), 4,53 (s, 1H), 3,70 (s, 1H), 3,60-3,25 (m, 7H), 3,20-3,05 (m, 2H), 1,55-1,38 (m, 4H), 1,37-1,20 (m, 4H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168,8, 167,7, 158,0, 129,2, 129,0, 128,6, 128,5, 116,1, 100,6, 91,50, 91,45, 89,69, 89,63, 75,5, 73,3, 70,2, 68,1, 60,3, 38,8, 38,1, 28,7, 26,9, 25,7, 25,4; RMN de <sup>19</sup>F (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -170,4, -170,5. EM (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> 431,2, hallado 431,1.

**Ejemplo de conjugación con el compuesto 42: Compuesto 43.** Se disolvió el compuesto **42** (5 mg, 12 µmol) en DMSO seco (1 ml) seguido de la adición de trietilamina (6 mg, 8 µl, 58 µmol) y finalmente éster Cy5-NHS (7 mg, 12 µmol). Se selló el recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó la mezcla de reacción con MeOH (1 ml) y se purificó directamente por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en H<sub>2</sub>O:ACN 99:1 a 5:95 durante 40 minutos) para dar el compuesto **43** (sal TFA) como un sólido azul (8 mg, rendimiento de un 68 %). EM (ESI) m/z (M)<sup>+</sup> calc. para C<sub>52</sub>H<sub>68</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> 895,5, hallado 895,2.

## Esquema 8



**Compuesto 44.** Se disolvió el compuesto **32** (200 mg, 0,546 mmol) en EtOAc (1 ml) seguido de la adición de trietilamina (166 mg, 1,64 mmol) y cloruro de propionilo (56 mg, 0,600 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se extrajo la mezcla de reacción con HCl 0,5 M (5 ml) y EtOAc (3 x 10 ml), se recogió la capa orgánica y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (hex : EtOAc 1:0 a 1:9) para dar el compuesto **44** como un sólido blanco (210 mg, rendimiento de un 91 %): RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 7,42 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,14 (s. a., 1H), 7,06 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 5,34 (s. a., 1H), 4,96 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 4,51 (d, 1H, J = 4,0 Hz), 3,15 (q, 2H, J = 6,8 Hz), 2,97 (q, 2H, J = 6,8 Hz), 2,58 (q, 2H, J = 7,6 Hz), 1,42-1,30 (m, 13H), 1,29-1,12 (m, 7H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 174,1, 173,0, 157,0, 151,6, 139,5, 128,8, 122,7, 78,98, 74,2, 41,0, 39,6, 30,7, 30,2, 28,7, 28,2, 27,07, 27,03, 9,36. EM (ESI) m/z (M+Na)<sup>+</sup> calc. para C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub><sup>+</sup> 445,2, hallado 445,2.

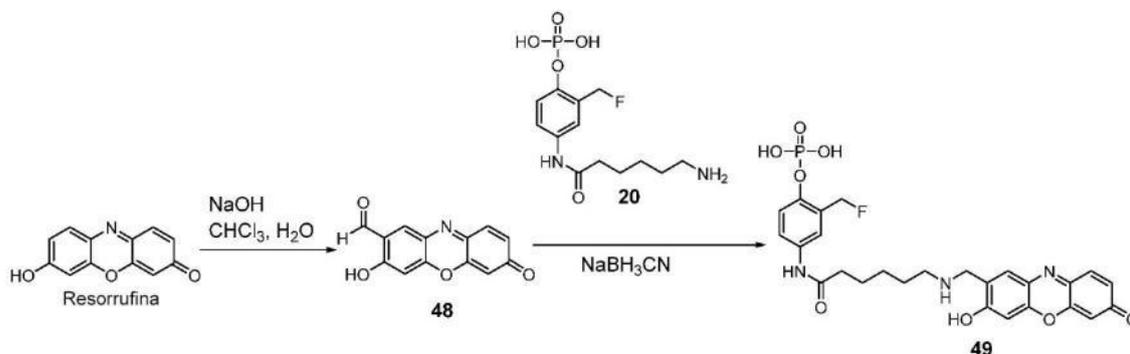
**Compuesto 45.** Se disolvió el compuesto **44** (200 mg, 0,473 mmol) en CHCl<sub>3</sub> (5 ml) en un frasco de centelleo sellado y se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo. A continuación se añadió gota a gota Deoxo-fluor<sup>®</sup> (110 mg, 0,497 mmol) y se selló el recipiente de reacción. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 1 hora, seguido de desactivación con HCl 0,5 M (5 ml). Se separó la capa orgánica y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Se filtró la suspensión, se recogió el filtrado y se retiraron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo resultante por cromatografía ultrarrápida (hex : EtOAc 1:0 a 1:9) para dar el compuesto **45** como un sólido blanco (155 mg, rendimiento de un 77 %): RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,39 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,04 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 6,81 (s. a., 1H), 5,68 (d, 1H, J = 48 Hz), 4,77 (s. a., 1H), 3,21 (q, 2H, J = 6,0 Hz), 3,00-2,95 (m, 2H), 2,52 (q, 2H, J = 7,6 Hz), 1,42-1,30 (m, 13H), 1,29-1,11 (m, 7H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172,5, 168,1, 167,9, 155,9, 151,19, 151,17, 132,4, 132,2, 127,53, 127,47, 121,5, 91,9, 90,0, 78,6, 40,02, 38,65, 29,7, 29,1, 28,2, 27,4, 26,0, 25,9, 8,7; RMN de <sup>19</sup>F (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -178,0. EM (ESI) m/z (M+Na)<sup>+</sup> calc. para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>FN<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup> 447,2, hallado 447,1.

**Compuesto 46.** Se disolvió el compuesto **45** (100 mg, 0,236 mmol) en una mezcla 1:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:TFA (1 ml) en un frasco de centelleo. Se selló el frasco y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se retiraron los disolventes a presión reducida y se descubrió que el residuo resultante era de pureza adecuada para etapas sintéticas posteriores. Se obtuvo el compuesto **46** como un aceite viscoso que se determinó que era la sal de TFA (100 mg, rendimiento de un 97 %). Se purificó una pequeña muestra por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en H<sub>2</sub>O:ACN 99:1 a 5:95 durante 40 minutos) para obtener una muestra analítica. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 7,09 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 6,98 (s. a., 1H), 5,72 (d, 1H, J = 48 Hz), 3,23 (s. a., 2H), 2,57 (q, 2H, J = 7,6 Hz), 1,60-1,40 (m, 4H), 1,39-1,15 (m, 7H); RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173,1, 169,0, 168,8, 151,52, 151,50, 132,5, 132,3, 128,0, 127,9, 121,9, 91,9, 90,1, 39,6, 38,7, 28,7, 27,6, 26,9, 25,5, 25,2, 8,9; RMN de <sup>19</sup>F (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -177,5. EM (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup> calc. para C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 325,2, hallado 325,2.

**Ejemplo de conjugación con el compuesto 46: Compuesto 47.** Se disolvió el compuesto **46** (sal TFA, 10 mg, 23 μmol) en DMSO seco (1 ml) seguido de la adición de trietilamina (7 mg, 10 μl, 68 μmol) y finalmente éster Cy5-NHS (15 mg, 25 μmol). Se selló el recipiente de reacción y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó la mezcla de reacción con MeOH (1 ml) y se purificó directamente por RP-HPLC prep (TFA al 0,05 % en H<sub>2</sub>O:ACN 99:1 a 5:95 durante 40 minutos) para dar el compuesto **47** (sal TFA) como un sólido azul

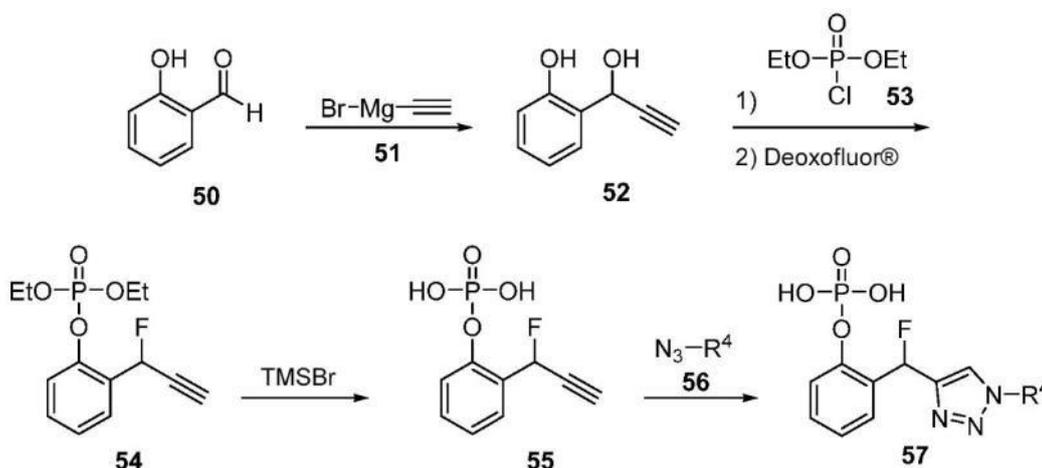
(12 mg, rendimiento de un 58 %). EM (ESI) m/z (M)<sup>+</sup> calc. para C<sub>49</sub>H<sub>62</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> 789,5, hallado 789,1.

### Esquema 10



- 5 Se trata resorufina con hidróxido de sodio en cloroformo y agua para formar el aldehído **48**. A continuación se hace reaccionar el aldehído **48** con el compuesto **20** en presencia de un agente reductor adecuado, tal como cianoborohidruro de sodio, para formar el compuesto **41**.

### Esquema 11



10

#### Síntesis de QM que contienen el conector 1,2,3-triazolilo por química "clic" de acida-alquino

Se prepara el compuesto **57** por la secuencia de reacción mostrada en el esquema 11. En primer lugar, se hace reaccionar salicialdehído (**50**) con bromuro de etinilmagnesio (**51**) para dar el compuesto **52**. A continuación, se hace reaccionar el compuesto **52** en secuencia con dietilclorofosfato (**53**) y Deoxofluor<sup>®</sup> para dar el compuesto **54**. Se desprotege el compuesto **54** con TMSBr para dar el fosfato de arilo **55**. Finalmente, se hace reaccionar el compuesto **55** con moléculas indicadoras funcionalizadas con acida terminal (N<sub>3</sub>-R<sup>4</sup>, compuesto **56**) para dar los conjugados QM-indicador que contienen un conector 1,2,3-triazolilo (**57**).

15

#### Ejemplo 2

##### Detección de diana usando QMP

Protocolo(s) de inmunohistoquímica (IHQ) general para QMP. Todos los experimentos de tinción IHQ se llevaron a cabo en una plataforma de tinción de tejido automatizada VENTANA BenchMark<sup>®</sup> XT y los reactivos usados en estos protocolos fueron de Ventana Medical sistemas, Inc. (Tucson, AZ, EE. UU.; "Ventana") a menos que se especifique de otro modo. Los anticuerpos anti-IgG de conejo caprinos policlonales, anticuerpos anti-IgG de ratón caprinos, peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP) se obtuvieron de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

30

Se realizaron las siguientes etapas comunes: (1) desparafinación con solución detergente EZ Prep (Ventana Medical sistemas, Inc. (VMSI), n.º 950-101) (75 °C; 20 minutos); (2) lavado con tampón de reacción (VMSI, n.º 950-300); (3) recuperación de antígeno en acondicionamiento celular 1 (VMSI n.º 950-124) (100 °C; dependiente del tiempo sobre el antígeno de interés); (4) lavado (igual que en la etapa 2); (5) para protocolos con etapas de detección de HRP posteriores se inactivó la peroxidasa endógena usando inhibidor iVIEW (VMSI, E253-2187) (37 °C; 4 minutos); (6)

35

lavado (igual que en la etapa 2); (7) incubación de anticuerpo primario (Ab) (37 °C; dependiente del tiempo sobre el anticuerpo primario que varía de 8 - 32 minutos); y (8) lavado (igual que en la etapa 2). Todas las etapas de incubación de reactivo posteriores se separaron por lavado como en la etapa (2).

- 5 Se usaron dos protocolos de tinción experimental, como se ilustra en las FIGS. 4 y 5 La incubación de anticuerpo primario (anticuerpo anti-diana) y el lavado se siguieron de la incubación de anticuerpo secundario con anticuerpo anti-especie policlonal caprino conjugado a AP (37 °C; 8 minutos) (FIG. 4). La incubación de anticuerpo primario y el lavado se siguieron de la incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-especie policlonal caprino, hapteno marcado con nitropirazol (NP) (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se añadió anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón conjugado a AP (37 °C; 8 minutos) (FIG. 5).

15 Detección 1 - DAB HRP. Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains (VMSI n.º 860-015). Se disolvieron los reactivos de QMP en CHES 100 mM (ácido 3-ciclo-hexilamino-etilsulfónico), pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP (VMSI n.º 253-2182) seguido de 100 µl de QMP marcado con hapteno e incubando a 37 °C durante 16 minutos. El compuesto 29 es un hapteno-QMP ejemplar que se pudo usar de acuerdo con el presente procedimiento. Posteriormente se unió el hapteno depositado por un conjugado HRP-anti-hapteno de ratón (o HRP-estreptavidina) (37 °C; 8 minutos), y se visualizó por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (hematoxilina II, VMSI n.º 790-2208) (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (VMSI n.º 760-2037) (37 °C; 4 minutos). A continuación se deshidrataron los portaobjetos a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos. La FIG. 13(A) muestra una microfotografía ejemplar de un portaobjetos teñido de acuerdo con el presente procedimiento.

25 Detección 2 - AP Red. Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvieron los reactivos de QMP en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con hapteno e incubando a 37 °C durante 16 minutos. El compuesto 29 es un hapteno-QMP ejemplar que se pudo usar de acuerdo con el presente procedimiento. Posteriormente se unió el hapteno depositado por un conjugado AP-anti-hapteno de ratón (o conjugado AP-estreptavidina) (37 °C; 8 minutos), y se logró la detección añadiendo 100 µl de potenciador de AP, seguido de 100 µl de naftol AS-TR fosfato y 200 µl de Fast Red KL (37 °C; 16 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). Se aclararon los portaobjetos con una mezcla de detergente y agua, se secó al aire y se tapó manualmente con cubreobjetos. Las FIGS. 14(B)-14(D) muestran microfotografías ejemplares de portaobjetos teñidos de acuerdo con el presente procedimiento.

40 Detección 3 - Punto cuántico. Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvieron los reactivos de QMP en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con hapteno e incubando a 37 °C durante 16 minutos. El compuesto 29 es un hapteno-QMP ejemplar que se pudo usar de acuerdo con el presente procedimiento. Posteriormente se visualizó el hapteno depositado por incubación con un conjugado de punto cuántico anti-hapteno de ratón (o conjugado de punto cuántico y estreptavidina) (37 °C; 32 minutos). Se lavaron los portaobjetos con tampón de reacción, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos. La FIG. 15C muestra una microfotografía ejemplar de un portaobjetos teñido de acuerdo con el presente procedimiento.

50 Detección 4 - Fluoróforo. Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con tampón citrato de sodio salino (SSC, VMSI n.º 950-110). Se disolvieron los reactivos de QMP en Tris 250 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con fluoróforo (a una concentración < 50 µM) e incubando a 37 °C durante 16 minutos. El compuesto 28 es un fluoróforo-QMP ejemplar que se pudo usar de acuerdo con el presente procedimiento. Se lavaron los portaobjetos con tampón de reacción, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos. Se vieron los portaobjetos por microscopía de fluorescencia usando los conjuntos de filtros apropiados. La FIG. 15A muestra una microfotografía ejemplar de un portaobjetos teñido de acuerdo con el presente procedimiento

60 Detección 5 - QMP cromogénico. Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con SSC. Se disolvieron los reactivos de QMP en Tris 250 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con cromóforo (a una concentración > 50 µM) e incubando a 37 °C durante 16 minutos. El compuesto 30 es un cromógeno-QMP ejemplar que se pudo usar de acuerdo con el presente procedimiento. En algunos casos, se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). Se aclararon los portaobjetos con una mezcla de detergente y agua, a continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos. Se vieron los portaobjetos por microscopía de campo claro. La FIG. 16(A) muestra una microfotografía ejemplar de un

portaobjetos teñido de acuerdo con el presente procedimiento.

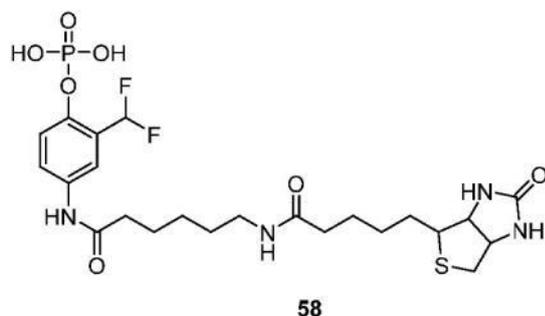
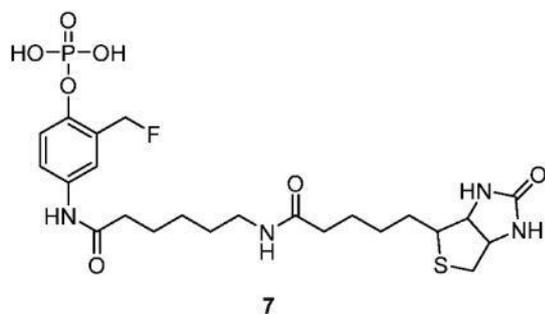
### Ejemplo 3

#### 5 DAB HRP amplificada por difluoro-QMP-biotina (FIG. 17)

(a) Control *ultraView* (FIG. 17(A)). Se desparafinó el tejido como se describe en los procedimientos generales, seguido de recuperación de antígeno con proteasa 1 (VMSI n.º 760-2018) (37 °C, 8 minutos). La incubación de anticuerpo anti-EGFR de ratón (37 °C, 32 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal caprino conjugado a HRP (37 °C; 8 minutos). Se visualizó el antígeno por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos) para cambiar la tonalidad de hematoxilina a azul. A continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

(b) QMP amplificó DAB (FIG. 17(B)). Se desparafinó el tejido como se describe en los procedimientos generales, seguido de recuperación de antígeno con proteasa 1 (37 °C, 8 minutos). La incubación de anticuerpo anti-EGFR de ratón (37 °C, 32 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal caprino conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvió difluoro-QMP-biotina en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 100 nM. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con biotina e incubando a 37 °C durante 16 minutos. Posteriormente se unió el hapteno depositado por el conjugado HRP-estreptavidina (37 °C; 8 minutos), y se visualizó por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

En la evaluación de los precursores de QM para tinción IHQ, se descubrió que la identidad del grupo saliente influyó en la actividad del QMP. Se prepararon dos precursores de *orto*-QM protegidos con fosfato, basados en material de partida de 4-nitrosalicilaldehído, que contenía las funcionalidades bencil-monofluoro (esquema 1, compuesto 7) y bencil-difluoro (compuesto 58):



Ambos compuestos utilizan fluoruro como grupo saliente, pero la reactividad de la QM derivada del compuesto difluoro 58 debe ser considerablemente menor que el monofluoro 7 debido a la estabilización electrónica ofrecida por el átomo de flúor geminal. De hecho, informes previos han sugerido que las QM derivadas de precursores con monofluoro pueden ser excesivamente reactivas como sondas de actividad enzimática, dando como resultado el marcaje del sitio activo y la posterior inhibición enzimática. Por lo tanto, en primer lugar se evaluó el compuesto precursor de difluoro-QM 58 para determinar el comportamiento de tinción IHQ en tejido FFPE usando el marcador

nuclear BCL6 en tejido de amígdala FFPE como sistema modelo. El precursor de difluoro-QM marcado con biotina se unió con éxito a la muestra como se evidenció por visualización de biotina posterior usando detección de diaminobencidina (DAB). La FIG. 18 proporciona microfotografías que ilustran el nivel de detección a concentraciones variables del precursor de difluoro-QM en un tampón Tris a pH = 8,5 (A - control DAB, B - 1  $\mu$ M, C - 10  $\mu$ M y D - 20  $\mu$ M). Además, se observó amplificación significativa de señal en comparación con la muestra de control DAB cuando se utilizaron concentraciones en portaobjetos del compuesto precursor de difluoro-QM 58 mayores de 20  $\mu$ M. Sin embargo, también se observó un incremento en la difusión de señal en todos los casos, dando como resultado una tinción colateral no deseable considerable.

Se sugirió que la difusión de señal por el precursor de difluoro-QM puede haber surgido de una combinación de dos factores cinéticos: (1) la tasa de expulsión del grupo saliente y formación de QM posterior después de la escisión del grupo fosfato; y (2) la tasa de desactivación de QM, por un nucleófilo sobre el tejido o bien en el medio de reacción. En el caso del compuesto precursor de difluoro-QM 58, el átomo de flúor geminal proporcionó estabilización que puede haber decelerado ambos factores, dando como resultado una difusión inaceptable del sitio diana. Se planteó la hipótesis de que al incrementar el pH del medio de reacción, se pueden acelerar las tasas tanto de formación como de desactivación de QM, dando lugar a mejores resultados de tinción. Para (1), un pH más alcalino incrementa la población de fenol desprotonado después de la escisión de fosfato, fomentando por lo tanto la expulsión de fluoruro y la formación de QM. Para (2), el incremento en el pH incrementaría la población de desactivadores disponibles tanto para el agua como el tampón (Tris), disminuyendo eficazmente la distancia a la que las QM podrían difundir desde la diana antes de la reacción con un nucleófilo.

Para someter a prueba el efecto de pH sobre la difusión de señal, se depositó el compuesto precursor de difluoro-QM 58 como antes a diversos niveles de pH dentro del intervalo de trabajo para AP (7 - 12 con dos brazos de actividad máxima a pH = 8,5 y 11). De nuevo se eligió el marcador nuclear BCL6 en tejido de amígdala FFPE como modelo. Se observó tinción positiva en todo el intervalo de pH, aunque se vio un equilibrio entre la difusión y señal global. Las FIGS. 19(A)-19(H) proporcionan microfotografías de los niveles de detección de precursor de QM 20  $\mu$ M en tampón Tris con pH variable: (A) control DAB; (B) pH = 7,0; (C) pH = 8,0; (D) pH = 8,5; (E) pH = 9,0; (F) pH = 10,0; (G) pH = 11,0; (H) pH = 12,0. Parece que la difusión disminuye con el incremento de pH. A un pH de 7, casi no se observó tinción específica viéndose una señal casi homogénea en toda la sección de tejido. A medida que se elevó el pH, la tinción colateral disminuyó gradualmente, aunque la difusión de señal global y la tinción colateral se mantuvieron significativas incluso a un pH de 12. El nivel de amplificación se incrementó solo a medida que se elevó el pH hasta 8,5 y a continuación disminuyó gradualmente durante el resto del intervalo. Este efecto se puede deber a una combinación de actividad enzimática y la población de desactivadores de QM en el medio de reacción. A niveles de pH por encima de las condiciones de reacción de AP óptimas (7,0), se redujo la actividad de AP, dando como resultado una señal baja. A medida que se incrementó el pH (8,0-8,5) aunque permaneció cerca del pKa de Tris (8,1), la actividad de AP se incrementó a una tasa más rápida que la población de desactivadores en el medio de reacción, dando lugar a un incremento significativo en la señal. Al elevar más el pH (9-10) se incrementó la población de desactivadores mientras que disminuyó la actividad de AP, dando como resultado una disminución de señal. Aunque la AP tuvo actividad máxima a pH 11 en Tris, se observó una ligera disminución en la intensidad de tinción, lo más probable debido a la población excesivamente alta de desactivadores que no se pudo superar por el incremento en la actividad de AP (elevar el pH de 8,5 a 11 incrementa [base Tris] aproximadamente un 50 %, incrementando la actividad de AP en solo aproximadamente un 20 %). Se determinó que incluso en el extremo superior del intervalo de pH, la difusión del compuesto precursor de difluoro-QM 58 todavía era demasiado grande para que fuera de uso clínico para IHQ. Esto contrasta con la divulgación de Bobrow, que sugería que un QMP basado en difluoro era adecuado para su uso como reactivo IHQ.

Se sugirió que utilizando el precursor de monofluoro-QM menos estable 7, se puede reducir la difusión por los motivos descritos anteriormente. En primer lugar se llevó a cabo la tinción IHQ en concentración IHQ de AP típica (pH 8,5 en tampón Tris) en todo el intervalo de concentración usando el marcador nuclear BCL6 en tejido de amígdala FFPE para determinar la concentración óptima de precursor de monofluoro-QM 7 (datos no mostrados). De forma sorprendente, se requirió una concentración mucho menor de precursor de monofluoro-QM 7 (250 nM) para dar el nivel deseado de amplificación en comparación con el precursor de difluoro-QM 58 (20  $\mu$ M). Además, se redujo en gran medida la difusión global en comparación con precursor de difluoro-QM 58, aunque todavía eran evidentes algo de difusión y tinción colateral a pH = 8,5. En un esfuerzo por reducir la difusión y tinción colateral, se sometió a prueba un intervalo de pH (7-12) en tampón Tris (FIGS. 20(A) - 20(H): (A) control DAB; (B) pH = 7,0; (C) pH = 8,0; (D) pH = 8,5; (E) pH = 9,0; (F) pH = 10,0; (G) pH = 11,0; (H) pH = 12,0). A pH bajo (7,0-8,0), se observó difusión significativa, creando una mancha similar a las observadas con el precursor de difluoro-QM 58. Sin embargo, se redujeron gradualmente la difusión y tinción colateral a medida que se elevó el pH, sin una disminución inaceptable en la señal global. A un pH de 10, casi se eliminaron la difusión y tinción colateral, produciendo una mancha con un nivel alto de señal junto con especificidad comparable al control DAB. El incremento de pH a más de 11-12 dio como resultado manchas ligeramente más nítidas como se evidenció por la contratinción de hematoxilina azul más vibrante. Sin embargo, se observó una ligera reducción en la señal global a estos niveles de pH mayores.

#### Ejemplo 4

DAB HRP amplificada por QMP-biotina con grupos salientes de amina cuaternaria (FIG. 21)

(a) Control *ultraView* (FIG. 21(A)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Ki-67 de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino conjugado a HRP (37 °C; 8 minutos). Se visualizó el antígeno por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos) para cambiar la tonalidad de hematoxilina a azul. A continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

(b) El precursor de análogo de quinona metida amplificó DAB (FIGS. 21(B)-(D)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Ki-67 de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvió piridina-QMP-biotina (100 µM) (FIG. 21(B)) o DABCO-QMP-biotina (100 µM) (FIG. 21(C)) o trietilamina-QMP-biotina (100 µM) (FIG. 21(D)) en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 100 nM. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con biotina e incubando a 37 °C durante 16 minutos. Posteriormente se unió el hapteno depositado por el conjugado HRP-estreptavidina (37 °C; 8 minutos), y se visualizó por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Estos resultados demuestran el comportamiento subóptimo de aminas cuaternarias como LG para esta aplicación, en comparación con el control. Los derivados de piridina, DABCO y trietilamina-QMP-biotina muestran todos una intensidad de tinción mucho menor y señales en gran medida difusas (FIGS. 21(B)-(D)) en comparación con el portaobjetos de control (FIG. 21(A)).

### Ejemplo 5

#### DAB HRP amplificada por QMP-biotina con diversos grupos salientes (FIG. 22)

(a) Control *ultraView* (FIG. 22(A)). Véase el ejemplo 4(a).

(b) QMP amplificó DAB (FIGS. 22(B)-22(D)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Ki-67 de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvió monofluoro-QMP-biotina (400 nM) (FIG. 22(B)) o acetato-QMP-biotina (100 µM) (FIG. 22(C)) o metoxi-QMP-biotina (100 µM) (FIG. 22(D)) en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 100 nM. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con biotina e incubando a 37 °C durante 16 minutos. Posteriormente se unió la biotina depositada por un conjugado HRP-estreptavidina (37 °C; 8 minutos), y se visualizó por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Se muestran dos LG subóptimos y uno óptimo en este ejemplo. El QMP-biotina con un LG acetato (FIG. 22(C)) genera una señal muy difusa débil y el QMP-biotina con un LG metoxi muestra una señal bien resuelta pero con intensidad baja (FIG. 22(D)). El derivado de LG monofluoro de QMP-biotina ((FIG. 22(B)) demuestra una señal bien resuelta con intensidad mayor o igual al portaobjetos de control (FIG. 22(A)). De todos los grupos de LG evaluados, el monofluoro da el mejor comportamiento.

### Ejemplo 6

#### DAB HRP amplificada por QMP-biotina con diferentes conectores (FIG. 23)

Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Bcl-2 de ratón (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal caprino conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvió monofluoro-QMP-biotina (con

conector anilina-amida (FIG. 23(A)), benzoico-amida (FIG. 23(B)) o tiramida-amida (FIG. 23(C)) (100 nM) en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 100 nM. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con biotina e incubando a 37 °C durante 16 minutos. Posteriormente se unió la biotina depositada por un conjugado HRP-estreptavidina (37 °C; 8 minutos), y se visualizó por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Este experimento demuestra el efecto sutil de grupos aceptadores de electrones (EWG) y grupos donantes de electrones (EDG) leves sobre el comportamiento de tinción funcional del QMP-biotina. El conector benzoico-amida (compuesto **21**, FIG. 2(A)) es un EWG leve y da como resultado una señal menos resuelta, más difusa. Los otros conectores que son EDG neutros (anilina-amida (compuesto **7**, FIG. 2(A))) o leves (tiramida-amida (compuesto **14**, FIG. 2(A))) generan señales bien resueltas. Otros experimentos (no incluidos aquí) con EDG fuerte (por ejemplo, metoxi) o EWG (por ejemplo, nitro) muestran un efecto mucho más perjudicial sobre el comportamiento de tinción. Esto ilustra la influencia de la electrónica sobre la reactividad de los intermedios de QMP y el efecto sobre el comportamiento de tinción.

## Ejemplo 7

### AP Fast Red amplificada por monofluoro-QMP-NP (FIG. 14)

Control Fast Red (FIG. 14(A)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-CD-10 de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación con un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo caprino, hapteno marcado con nitropirazol (NP) (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se añadió anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Se logró la detección añadiendo 100 µl de potenciador de AP, seguido de 100 µl de naftol AS-TR fosfato y 200 µl de Fast Red KL (37 °C; 16 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). Se aclararon los portaobjetos con una mezcla de detergente y agua, se secó al aire y se tapó manualmente con cubreobjetos.

QMP amplificó Fast Red (FIG. 14(B)-14(D)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-CD-10 de conejo, anti-Bcl-2 de ratón o anti-Her3 de ratón (37 °C, 32 minutos) y el lavado se siguieron de incubación con un anticuerpo anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón policlonal caprino, hapteno marcado con nitropirazol (NP) (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se usó anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón conjugado a AP como anticuerpo terciario (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvió monofluoro-QMP-NP (100 nM) en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 100 nM. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con NP e incubando a 37 °C durante 16 minutos. Posteriormente se unió el hapteno depositado por un conjugado AP-anti-hapteno de ratón (37 °C; 12 minutos), y se logró la detección añadiendo 100 µl de potenciador de AP, seguido de 100 µl de naftol AS-TR fosfato y 200 µl de Fast Red KL (37 °C; 16 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). Se aclararon los portaobjetos con una mezcla de detergente y agua, se secó al aire y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Este ejemplo demuestra que una vez que se deposita un indicador (en este caso el NP-hapteno) por metodología de QMP, entonces también se puede usar un sistema de detección alternativo para DAB. En este caso, se usa un conjugado de AP anti-NP para visualizar la diana con química AP Fast Red. La FIG. 14(B) muestra una amplificación significativa en la señal sobre el portaobjetos de control (FIG. 14(A)). Las FIGS. 14(C) y 14(D) muestran una tinción de intensidad fuerte para biomarcadores que normalmente se visualizan débilmente Bcl2 y Her3.

## Ejemplo 8

### Monofluoro-QMP-fluoróforo y punto cuántico amplificado por monofluoro-QMP-NP (fig. 15)

(a) QMP-fluoróforo (FIGS. 15(A), 15(B)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Bcl-2 de ratón (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal caprino, hapteno marcado con nitropirazol (NP) (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se añadió anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvió monofluoro-QMP-TAMRA (FIG. 15(A)) o monofluoro-QMP-Alexa Fluor<sup>®</sup> 700 (FIG. 15(B)) en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con fluoróforo e incubando a 37 °C durante 16 minutos. Se

lavar los portaobjetos con tampón de reacción, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos. Se vieron los portaobjetos por microscopía de fluorescencia usando los conjuntos de filtros apropiados.

5 (b) QMP amplificó el punto cuántico (FIG. 15(C)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Bcl-2 de ratón (37 °C, 16 minutos) y el lavado se  
 10 siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal caprino, hapteno marcado con nitropirazol (NP) (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se añadió anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos  
 con lavado Special Stains. Se disolvió monofluoro-QMP-NP en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con NP e  
 15 incubando a 37 °C durante 16 minutos. Posteriormente se visualizó el hapteno depositado por incubación con un conjugado de punto cuántico 525 anti-NP de ratón (37 °C; 32 minutos). Se lavaron los portaobjetos con tampón de reacción, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con  
 cubreobjetos. Se vieron los portaobjetos por microscopía de fluorescencia usando los conjuntos de filtros apropiados.

20 Cuando se usan fluoróforos como indicador en una molécula QMP (FIG 15(A) y 15(B)) entonces se pueden visualizar los resultados con cualquier química de detección adicional que genere una señal fluorescente amplificada. Se puede detectar QMP-NP de forma fluorescente usando un conjugado de cuántico-estreptavidina. Esto ofrece una forma alternativa de detectar el hapteno depositado en comparación con el procedimiento HRP/DAB explicado en los ejemplos 3-6. Esto ilustra que se puede usar la metodología de QMP para generar señales  
 25 amplificadas tanto de campo claro como de campo oscuro (fluorescentes) y se adapta fácilmente para funcionar con químicas de detección existentes.

25

### Ejemplo 9

#### DAB HRP amplificada por QMP-NP (FIGS. 13, 24 - 25)

30 (a) Control *ultraView* (FIG. 13(B), FIGS. 24(A) - 24(B); 24(B) muestra la región de 24(A) delimitada por una caja negra a mayor aumento). Véase el ejemplo 4(a).

(b) QMP amplificó DAB (FIG. 13(A), FIGS. 25(A) - 25(B); 25(B) muestra la región de 25(A) desmarcada por una caja  
 35 negra a mayor aumento). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Ki-67 de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los portaobjetos con lavado Special Stains. Se disolvió monofluoro-QMP-NP (100 nM) en CHES 100 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de  
 40 100 nM. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl de QMP marcado con NP e incubando a 37 °C durante 16 minutos. Posteriormente se unió el hapteno depositado por un conjugado HRP-anti-NP de ratón (37 °C; 8 minutos), y se visualizó por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos). Se varió el tono de la DAB por la adición de sulfato de  
 45 cobre (37 °C; 4 minutos). Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Este ejemplo demuestra la amplificación de señal usando QMP-NP seguido de detección HRP/DAB. Aunque la intensidad de señal es mayor, no se genera fondo adicional y la localización de la señal es equivalente al  
 50 portaobjetos de control.

50

### Ejemplo 10

#### QMP con restos de marcador detectable de cromóforo (FIG. 16)

55 QMP con restos de marcador detectable de cromóforo (FIGS. 16(A)-16(D)). Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Ki-67 de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación secundaria con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino, hapteno marcado con nitropirazol (NP) (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se añadió anticuerpo monoclonal anti-NP de ratón conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Después de incubar con el conjugado de AP, se lavaron los  
 60 portaobjetos con SSC. Se disolvieron monofluoro-QMP-PEG8-dabsilo (250 µM) (FIG. 16(A)) o monofluoro-QMP-TAMRA (250 µM) (FIG. 16(B)) o monofluoro-QMP-Cy5 (250 µM) (FIG. 16(C)) o monofluoro-QMP-rodamina 110 (250 µM) (FIG. 16(D)) en Tris 250 mM, pH 10,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100 µl de potenciador de AP seguido de 100 µl del QMP apropiado e incubando a 37 °C durante 32 minutos. Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó  
 65 con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se deshidrataron los portaobjetos a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Los ejemplos 2-9 han demostrado que se pueden visualizar QMP-indicadores por químicas de detección existentes (HRP/DAB y AP/Fast Red) y directamente por fluorescencia. Este ejemplo demuestra que si un cromóforo con un coeficiente de extinción grande es la molécula indicadora, entonces la señal de QMP amplificada se puede ver directamente por microscopía de campo claro. Al seleccionar cromóforos con diferentes longitudes de onda de absorción, entonces se puede crear un gran intervalo de colores discretos (FIGS. 16(A)-(D)). La capacidad de uso de una única molécula de núcleo (QMP) con diferentes indicadores para generar múltiples sistemas de detección cromogénica es de fundamental importancia para múltiples aplicaciones. Previamente a generar nuevos sistemas de detección cromogénicos, es necesario inventar nuevas químicas y cada enzima necesita un enfoque diferente. La capacidad de uso de una única molécula de núcleo de QMP con diferentes moléculas indicadoras y/o diferentes grupos de reconocimiento enzimático proporciona nuevas herramientas para múltiples ensayos de campo claro (y fluorescentes).

### Ejemplo 11

#### Experimentos de atrapamiento

Para investigar el mecanismo de tinción y desactivación, se realizó un intento de atrapar el intermedio de QM formado por un precursor de monofluoro-QM 7 en fase en solución en condiciones similares a las utilizadas en los experimentos de tinción (FIG. 26). Se disolvió el precursor de QM 7 en tampón Tris pH 10 seguido de la adición de una cantidad catalítica de AP. Se realizó un seguimiento del progreso de la reacción por HPLC-EM (FIG. 27). En 10 minutos, se observó la conversión completa en el aducto de Tris 7-tris (FIG. 27(C)). En ausencia de AP, no tuvo lugar ninguna reacción, lo que sugiere un alto nivel de estabilidad en las condiciones de reacción deseadas (FIG. 27(B)). Estos resultados apoyan firmemente el mecanismo propuesto de tinción mediada por QM y dilucida la base Tris como la fuente primaria de desactivadores en condiciones de tinción IHQ.

Se realizaron experimentos de atrapamiento adicionales para demostrar la capacidad de generar y atrapar quinona metidas en solución a partir de precursores de QM que comprenden un fosfato, un galactósido y un acetato como grupo de reconocimiento de enzima. Se trató cada precursor de QM en solución con la enzima correspondiente y se realizó un seguimiento del progreso de la reacción por HPLC-EM (datos no mostrados). Se diluyó cada sustrato hasta 1 mM en una solución de Tris 250 mM a pH adecuado para la enzima análoga (10 para fosfatasa alcalina, 8,0 para  $\beta$ -galactosidasa, y 8,0 para lipasa), seguido de la adición de la enzima análoga de modo que la concentración final de enzima en solución fue de 1 mM. Se incubaron las reacciones a temperatura ambiente durante 30 minutos, punto en el que se realizó la HPLC-EM. En cada caso, se detectó el aducto de Tris, lo que demuestra que la QM se estaba formando con éxito.

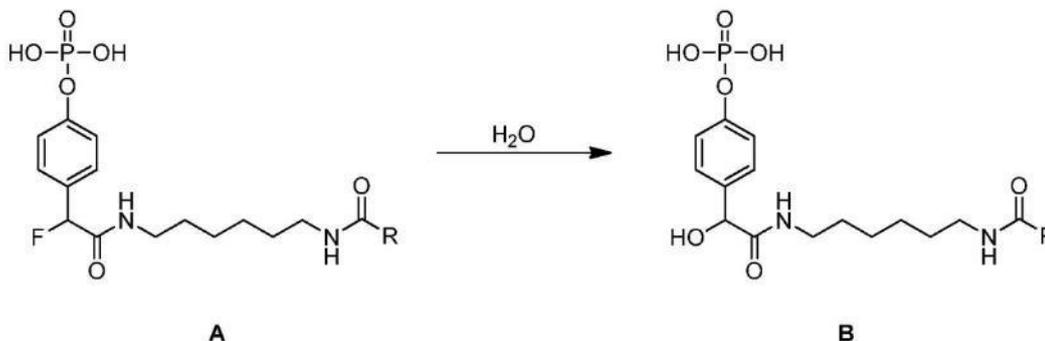
### Ejemplo 12

#### Estabilidad

Un aspecto de la presente divulgación es que son preferentes compuestos con inestabilidad suficiente por que la reacción debe avanzar rápidamente tras interactuar con la enzima activadora; sin embargo, esta inestabilidad se debe equilibrar con el objetivo de hacer que estas composiciones sean útiles dentro del alcance de su uso destinado, como se describe en el presente documento. En particular, el uso de estos reactivos como reactivos de detección para IHQ e ISH automatizadas requiere que los reactivos sean suficientemente estables en un recipiente de modo que se puedan enviar a los médicos que a continuación pueden almacenar y usar los reactivos durante un período de tiempo significativo. Las vidas útiles en almacenamiento pertinentes para composiciones de este tipo serían 12 meses, 18 meses, 24 meses, o mayor estabilidad. Aunque se pueden especificar las condiciones de almacenamiento, el uso de los reactivos en un instrumento clínico a menudo requiere que el reactivo tenga una estabilidad a temperatura ambiente significativa. De acuerdo con un modo de realización, las composiciones de la presente divulgación tienen una estabilidad adecuada para IHQ e ISH automatizadas. Cabe destacar que la idoneidad para ISH y IHQ automatizadas no requiere una estabilidad absoluta; más bien, que una cantidad sustancial del compuesto permanezca después de un período de tiempo establecido de modo que el uso del reactivo no se vea afectado negativamente por la descomposición del reactivo.

En referencia ahora a la FIG. 28, se muestran cuatro estructuras para los compuestos sometidos a prueba para determinar la estabilidad adecuada. La FIG. 28(A) es un QMP *para*-disustituido conjugado a TAMRA (B) es un QMP *para*-disustituido conjugado a dabsilo (C) es un QMP *orto*-disustituido conjugado a dabsilo, (D) es un QMP *orto*-disustituido conjugado a Cy5. En referencia ahora a la tabla 1, se muestra la estabilidad de los compuestos mostrados en la FIG. 28(A) y (B) en agua a temperatura ambiente (20-25 °C). Parece que la degradación del conjugado de QMP-tinte es independiente de la identidad del tinte. Sin limitarse a una teoría o mecanismo particular, se entendió que el modo principal de degradación fue el desplazamiento del fluoruro por agua para generar un compuesto que no tiene la capacidad de teñir tejido. El esquema 14 muestra la degradación hidrolítica de un QMP A representativo al compuesto sin tinción B.

## Esquema 14



5 Se descubrió que los compuestos se degradan demasiado rápido como para almacenarse en una solución acuosa no tamponada. En particular, se observó que solo aproximadamente un 42 % del QMP de la FIG. 28(A) y aproximadamente un 44 % del QMP de la FIG. 28(B) permanecieron después de 12 días. Se usaron los reactivos en un autoteñidor y se confirmó que la señal disminuyó en comparación con un reactivo recién sintetizado.

Tabla 1

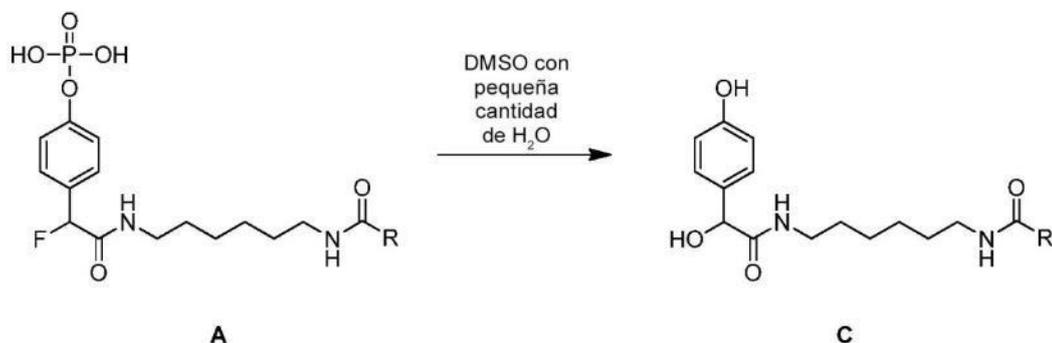
Compuesto de la FIG. 28		28(A)	28(B)	28(A)	28(A)	28(A)	28(B)	28(B)	28(B)
Disolvente		H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
Temperatura (°C)		20-25	20-25	30	45	60	30	45	60
Tiempo (días)	0,0	100,0	100,0	96,7	96,6	94,3	93,9	94,0	94,3
	0,2	88,5	90,6	-	-	-	-	-	-
	2,0	76,1	81,3	96,8	96,4	94,7	94,0	93,6	92,6
	4,0	-	-	96,4	96,2	93,4	94,2	93,8	91,6
	5,0	68,8	73,8	-	-	-	-	-	-
	7,0	61,1	64,1	96,4	96,0	91,4	97,9	97,6	94,2
	9,0	-	-	96,3	95,9	89,5	98,0	97,3	92,4
	11,0	-	-	96,2	95,4	87,5	97,7	97,0	91,0
	12,0	41,9	44,1	-	-	-	-	-	-
	14,0	-	-	96,4	95,6	84,4	97,7	97,0	89,4
	16,0	-	-	96,5	95,0	83,5	97,8	97,0	87,8
	18,0	-	-	96,0	95,3	83,3	97,2	96,6	83,0
	21,0	-	-	95,7	94,5	77,9	93,6	92,8	80,4
	23,0	-	-	95,8	94,8	77,2	93,4	92,3	77,0
	25,0	-	-	95,6	94,5	76,5	93,3	91,6	75,9
28,0	-	-	95,8	94,0	74,0	93,1	91,7	75,2	

10 Para evitar el problema de hidrólisis, se realizó una solución para almacenar los compuestos en un disolvente orgánico no nucleófilo anhidro (por ejemplo, DMSO o carbonato de propileno). La tabla 1 muestra datos para un estudio de estabilidad acelerada donde los compuestos de la FIG. 28(A) y (B) se almacenaron a tres temperaturas elevadas (30, 45 y 60 °C). De nuevo el comportamiento de los diferentes conjugados de tinte, cuando la porción de QMP del compuesto se mantiene igual, es muy similar. A temperatura elevada se observó una vía de degradación diferente (esquema 15). En particular, se descubrió que la degradación de QMP en DMSO con pequeña cantidad de agua a temperaturas elevadas hidrolidroliza tanto el grupo fluoro como el fosfato. Cuando se almacenó en DMSO, se diluyeron los materiales de QMP con un tampón de tinción cerca del momento de uso. Se entiende que algunos autoteñidores pueden realizar una etapa de predilución para preparar los reactivos; por tanto, este enfoque proporciona la estabilidad a largo plazo necesaria en un formato que puede funcionar dentro de un uso destinado para los compuestos.

15

20

## Esquema 15



Para investigar además la estabilidad acuosa de estos compuestos, se almacenó el compuesto de la FIG. 28(A) en tres tampones diferentes a diversos pH (véase la tabla 2). Se observó que menores pH de la solución tampón prolongan la vida útil en almacenamiento del compuesto de tinción activo.

Tabla 2

Compuesto de la FIG. 28		28(B)	28(B)	28(B)
Disolvente		Tris pH 10	Acetato pH 4	Glicina pH 2
Temperatura (°C)		20-25	20-25	20-25
Tiempo (días)	0,0	100,0	100,0	100,0
	0,1	69,8	97,2	-
	0,2	55,1	95,0	99,6
	1,0	11,1	89,9	93,7
	1,2	7,6	88,5	94,4
	1,9	2,5	86,3	93,0
	2,0	-	-	-
	2,1	1,9	85,6	91,3
	4,0	-	-	-
	5,0	1,3	73,4	87,2
	7,0	-	-	-
	8,0	1,3	64,8	82,6
9,0	1,3	62,5	82,2	

Con una comprensión de las vías y características de degradación, se diseñó un sistema de disolventes para el propósito de prolongar la vida útil en almacenamiento de los compuestos de QMP. Se descubrió que un sistema de disolventes que comprende una mezcla 50/50 de DMSO y tampón glicina 10 mM (pH 2,0), denominado tampón A en el presente documento, presenta estabilidad adecuada. La tabla 3 muestra datos para un estudio de estabilidad acelerada donde se almacenaron los compuestos a diferentes temperaturas (2, 25, 37 y 45 °C) en una mezcla 50/50 de DMSO y tampón glicina 10 mM (pH 2,0). A temperatura elevada todavía se observó la vía de degradación descrita en la FIG. 3C. Sin embargo, en condiciones de almacenamiento normales (2 - 25 °C) se reduce la tasa de descomposición del QMP en comparación con sistemas acuosos al 100 %.

Tabla 3

Compuesto de la FIG. 28		28(A)	28(A)	28(A)	28(A)	28(C)	28(D)
Disolvente		Tampón A					
Temperatura (°C)		2	25	37	45	20-25	20-25
Tiempo (días)	0,0	96,3	96,3	94,3	94,2	100,0	99,9
	1,0	-	-	-	-	100,0	99,8
	4,0	-	-	-	-	100,0	95,4
	8,0	96,2	94,1	76,9	80,1	100,0	95,6

	10,0	-	-	-	-	100,0	95,7
	14,0	-	-	-	-	100,0	95,1
	15,0	96,2	93,3	64,9	68,4	-	-
	17,0	-	-	-	-	100,0	95,8
	22,0	96,7	92,4	55,2	59,1	-	-
	25,0	-	-	-	-	97,8	95,5
	30,0	96,7	91,2	46,4	49,9	-	-
	36,0	-	-	-	-	96,7	94,0
	60,0	97,1	86,1	19,0	25,5	-	-

La tabla 3 también muestra datos para la estabilidad de compuestos de QMP alternativos (mostrados como FIG. 28(C) y (D)) en la misma mezcla 50/50 de DMSO y tampón glicina 10 mM (pH 2,0). Los datos iniciales indican que los *orto*-QMP tienen una estabilidad mejorada sobre los *para*-QMP en estas condiciones de almacenamiento.

5

### Ejemplo 13 - sal y cofactores

El magnesio es un cofactor requerido para la fosfatasa alcalina (AP) y por tanto se espera que la tasa de recambio de un QMP por AP sería dependiente de la concentración de magnesio. Sin embargo, se descubrió un efecto sorprendente de la concentración de sales de magnesio sobre la calidad de tinción. De nuevo, se entendió que la intensidad de señal mejoraría con un incremento en la concentración de magnesio debido a su papel como cofactor. Sin embargo, no se esperó que mejorara la calidad de señal. En particular, las calidades mejoradas fueron localización, separación y difusión reducida de la señal. De hecho, se esperó que estas calidades en realidad pudieran disminuir al incrementar el magnesio ya que la mayor intensidad de señal se podría correr o bien potenciar la capacidad de correr fuera de la localización de la diana. En referencia ahora a las FIGS. 29(A)-29(B), se muestran fotomicrografías de tejido de amígdala teñido para determinar la presencia de CD8 con un QMP-TAMRA, con la variable singular de cloruro de magnesio 0,125 M (FIG. 29(B)) y cloruro de magnesio 1,05 M (FIG. 29(A)). Cuando las fotomicrografías y reproducciones de las mismas no muestran la significación de la diferencia tan drásticamente como se desea, la muestra de cloruro de magnesio 1,05 M presentó una calidad de mancha mucho mejor en comparación con la muestra de magnesio 0,125 M. En modos de realización ilustrativos, los procedimientos y composiciones de acuerdo con la presente divulgación incluyen sal mayor de aproximadamente 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M, 1,0 M o 1,25 M, tal como cloruro de magnesio. En otros modos de realización, los procedimientos y composiciones de acuerdo con la presente divulgación incluyen cloruro de magnesio entre aproximadamente 0,1 M y aproximadamente 2 M, entre aproximadamente 0,25 M y 1,5 M, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1,25 M o aproximadamente 1,0 M. También se observó un efecto similar para la concentración de NaCl, pero el efecto no fue tan grande.

Estos datos combinados, combinados con el estudio de concentración de cloruro de magnesio, dio lugar a la actual configuración del kit donde existen al menos dos componentes; el primero es un ajuste de pH (Tris 0,5 M, pH 10,0) y el segundo es el QMP formulado en combinación de disolvente orgánico (por ejemplo, DMSO) y glicina 10 mM (pH 2,0) con cloruro de magnesio hasta 1,0 M.

### Ejemplo 14

#### QMP con restos indicadores de cromóforo y desencadenantes de $\beta$ -galactosidasa (FIG. 30)

Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anticuerpo anti-Ki-67 de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación secundaria con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino, hapteno marcado con biotina (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se añadió estreptavidina conjugada a  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) (Life Technologies n.º S-931) (37 °C; 32 minutos). Después de incubar con el conjugado de  $\beta$ -Gal, se lavaron los portaobjetos con SSC. Se disolvieron monofluoro- $\beta$ -Gal-QMP-Cy5 (125  $\mu$ M) (FIGS. 30(A) - 30(B)) o  $\beta$ -Gal-QMP-Cy3 (100  $\mu$ M) (FIG. 30(C)) en Tris 250 mM, pH 8,0, Brij-35 al 0,05 %. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100  $\mu$ l de potenciador de AP seguido de 100  $\mu$ l del  $\beta$ -Gal-QMP apropiado e incubando a 37 °C durante 32 minutos. Se contratificaron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azulante (37 °C; 4 minutos) (FIGS. 30(B) - 30(C)) o Red Counterstain II (VMSI n.º 780-2218) (37 °C; 4 minutos) (FIG. 30(A)). A continuación se aclararon los portaobjetos con una mezcla de detergente y agua, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

La  $\beta$ -galactosidasa ha sido como una enzima para la detección IHQ previamente con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (BCIG) como reactivo de detección. Sin embargo, es el único color disponible, es desigual, tiene mala sensibilidad y propenso a decolorarse (o desteñir) durante el procesamiento posterior de los portaobjetos. Los ejemplos en las FIGS. 30(A) - 30(C) muestran un sistema de detección IHQ cromogénico basado en  $\beta$ -galactosidasa que no es susceptible de deshidratación de alcohol, tiene buena sensibilidad y se puede modificar fácilmente para

generar un amplio intervalo de colores.

### Ejemplo 15

#### 5 Mancha doble con detección simultánea de QMP activado con AP y $\beta$ -Gal (FIG. 31)

Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación con anticuerpo anti-Ki-67 de conejo y anticuerpo anti-Bcl-6 de ratón (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino conjugado a biotina y un anticuerpo anti-IgG de ratón policlonal caprino conjugado a AP (37 °C; 12 minutos). Posteriormente se incubaron los portaobjetos con estreptavidina conjugada a  $\beta$ -Gal (37 °C; 32 minutos) seguido de lavado con SSC. Se disolvieron fosfo-QMP-Cy5 y  $\beta$ -Gal-QMP-Peg8-dabsilo en Tris 250 mM, pH 8,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 250  $\mu$ M cada uno. Se logró el recambio de QMP añadiendo 100  $\mu$ l de potenciador de AP seguido de 100  $\mu$ l de mezcla de QMP e incubando a 37 °C durante 60 minutos. Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina de Mayer modificada (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se aclararon con una mezcla de detergente y agua, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Algunas de las ventajas del uso de múltiples enzimas para múltiples ensayos son la reducción global en el tiempo de ensayo y reducción de etapas de inactivación enzimática/elución. Este ejemplo muestra un sistema de detección IHQ cromogénico doble donde ambas detecciones enzimáticas se llevan a cabo al mismo tiempo. Este resultado demuestra la especificidad de cada QMP por su enzima análoga y además la disponibilidad de sitios de unión suficientes para que ambas detecciones se produzcan sin restricciones.

### 25 Ejemplo 16

#### Mancha triple con detección simultánea de sustratos HRP, AP y $\beta$ -Gal (FIG. 32)

Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anti-PR de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino conjugado a biotina (37 °C; 8 minutos) y posteriormente suero de conejo (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se incubaron simultáneamente anti-ER de conejo marcado con benzofurano (BF) y anti-HER2 de conejo marcado con dinitrofenol (DNP) (37 °C; 16 minutos). A continuación se aplicaron los tres conjugados enzimáticos: estreptavidina conjugada a  $\beta$ -Gal, HRP conjugada a anti-BF de ratón y AP conjugada a anti-NP de ratón (37 °C; 32 minutos); seguido de lavado con SSC. Se disolvieron  $\beta$ -Gal-QMP-Cy5 y fosfo-QMP-PEG8-dabsilo en Tris 250 mM, pH 8,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 300  $\mu$ M cada uno. Se logró el recambio de cromógeno añadiendo 100  $\mu$ l de potenciador de AP seguido de 100  $\mu$ l de mezcla de QMP, 100  $\mu$ l de DISCOVERY Purple (VMSI n.º 760-229) y 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 %) e incubando a 37 °C durante 32 minutos. Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina II (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se aclararon con una mezcla de detergente y agua, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

Este ejemplo muestra un sistema de detección IHQ cromogénico triple donde todas las detecciones enzimáticas se llevan a cabo al mismo tiempo. Este resultado refuerza la especificidad de cada QMP por su enzima análoga. Muestra la disponibilidad de sitios de unión suficientes no solo para que las detecciones de QMP se produzcan sin restricciones, sino también el hecho de que todavía pueda avanzar la detección de HRP/tiramida.

### Ejemplo 17

#### 50 Mancha cuádruple con detección secuencial de sustratos HRP (dos veces), AP y $\beta$ -Gal (FIGS. 33-34)

Se desparafinó el tejido y se recuperó como se describe en los procedimientos generales. La incubación de anti-PR de conejo (37 °C, 16 minutos) y el lavado se siguieron de incubación de anticuerpo secundario con un anticuerpo anti-IgG de conejo policlonal caprino conjugado a biotina (37 °C; 8 minutos) y posteriormente suero de conejo (37 °C; 8 minutos). Después del lavado, se incubaron simultáneamente anti-ER de conejo marcado con benzofurazano (BF), anti-Ki67 de conejo marcado con NP y anti-HER2 de conejo marcado con dinitrofenol (DNP) (37 °C; 16 minutos). Se añadió HRP conjugada a anti-DNP de ratón (37 °C; 8 minutos), y se visualizó por medio de un precipitado marrón producido por HRP tras la adición de peróxido de hidrógeno y DAB (37 °C; 8 minutos) que se varió de tono con sulfato de cobre. A continuación se aplicaron  $\beta$ -Gal conjugada a estreptavidina, HRP conjugada a anti-BF de ratón y AP conjugada a anti-NP de ratón (37 °C; 32 minutos). Se detectó la HRP con 100  $\mu$ l de DISCOVERY Purple (VMSI n.º 760-229) y 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 %) (37 °C; 32 minutos) seguido de lavado con SSC. Se disolvieron  $\beta$ -Gal-QMP-Cy5 y fosfo-QMP-PEG8-dabsilo en Tris 250 mM, pH 8,0, Brij-35 al 0,05 % hasta una concentración final de 300  $\mu$ M cada uno. Se logró el recambio de cromógeno añadiendo 100  $\mu$ l de potenciador de AP seguido de 100  $\mu$ l de mezcla de QMP, e incubando a 37 °C durante 32 minutos. Se contratiñeron las secciones de tejido teñido con hematoxilina II (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se aclararon con una mezcla de detergente y agua, se deshidrataron a través de series de

etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

### Ejemplo 18

#### 5 ISH cromogénica (FIGS. 35(A) - 35(B))

Se desparafinó el tejido como se describe en los procedimientos generales seguido de pretratamiento con acondicionamiento celular 2 (VMSI n.º 950-123) (90 °C; 28 minutos) y tratamiento con proteasa 3 (VMSI n.º 780-4149) (37 °C; 20 minutos). Se aplicó la sonda de cromosoma 17, marcada con DIG (VMSI n.º 760-1224) al tejido, se desnaturalizó (80 °C; 20 minutos) y se hibridó a 44 °C durante 6 horas. Después de tres lavados de restricción a 76 °C con SSC, se incubó la muestra con anticuerpo anti-DIG de ratón (37 °C; 20 minutos), seguido de anticuerpo anti-IgG de ratón caprino conjugado a AP (37 °C; 24 minutos). Se disolvieron fosfo-QMP-PEG8-dabsilo y fosfo-QMP-Cy5 en 1:1 DMSO : tampón glicina 10 mM (pH 2,0) hasta una concentración final de QMP-dabsilo 120 µM y QMP-Cy5 30 µM con cloruro de magnesio 1 mM. Después del lavado con SSC, a continuación se añadieron 200 µl de solución de ajuste de pH (Tris 500 mM, pH 10,0) y 100 µl de la mezcla de QMP (37 °C; 32 minutos). Se contratificaron las secciones de tejido teñido con hematoxilina II (37 °C; 4 minutos) y a continuación se incubó con reactivo azuleante (37 °C; 4 minutos). A continuación se aclararon con una mezcla de detergente y agua, se deshidrataron a través de series de etanol graduado, se aclaró con xileno y se tapó manualmente con cubreobjetos.

20 Para aplicaciones de ISH los compuestos de *orto*-QMP mostraron mejor comportamiento que los compuestos de *para*-QMP. Aunque los compuestos de *para*-QMP generaron señales de ISH, la intensidad fue baja, el número de células teñidas (cobertura celular) fue desigual y la calidad de señal no fue óptima. Los compuestos de *orto*-QMP generaron señales de intensidad más fuerte, con incremento en la cobertura celular y resolución de señal mucho mejor con difusión reducida.

25

### Ejemplo 19

#### Mancha cuádruple con detección secuencial de HRP (dos veces) y AP (dos veces) (FIG. 36)

30 La FIG. 36 proporciona ejemplos de cuatro protocolos de tinción diferentes (A-D) que muestran los mismos biomarcadores (Her2 (membrana), Ki-67 (nuclear), ER (nuclear) y PR (nuclear) en tejido de mama FFPE) con combinaciones de colores intercambiados y/o diferentes (aumento de 40x). Como existían tres marcadores nucleares y un marcador de membrana, fue posible el uso de DAB para la tinción de membrana para Her2 en algunos protocolos, evitando la superposición de DAB con otros colores. Las mezclas de las detecciones nucleares (amarillo, azul y morado) generaron combinaciones de colores diferentes dependiendo de la intensidad.

35

El ensayo incluyó la detección secuencial de los biomarcadores usando dos detecciones basadas en HRP y dos detecciones basadas en QMP AP. Esto demostró la flexibilidad e intercambiabilidad de los sistemas de detección divulgados.

40

### Ejemplo 20

#### Mancha cuádruple con detección secuencial de HRP (dos veces) y AP (dos veces) (FIG. 37)

45 La FIG. 37 proporciona ejemplos de protocolos de tinción diferentes (A-B o C-D) que muestran los mismos biomarcadores (CD3 (membrana), CD8 (membrana), CD20 (membrana) (o CD68 (membrana)) y FoxP3 (nuclear) en tejido de amígdala FFPE) con combinaciones de colores intercambiados y/o diferentes (aumento de 5x). Se utilizó detección secuencial, usando dos detecciones basadas en HRP y dos detecciones basadas en QMP AP, demostrando además la flexibilidad e intercambiabilidad de los sistemas de detección divulgados.

50

### Ejemplo 21

55 Siguiendo el protocolo explicado en el ejemplo 10, se tiñó tejido de mama con un anticuerpo primario monoclonal anti-E-cadherina de ratón (Ventana n.º 790-4497) usando el compuesto 36 a una concentración de 500 µM (FIG. 38(A)) o bien el compuesto 28 a una concentración de 400 µM (FIG. 38(B)). Se esperó que ambos dieran resultados equivalentes, pero sorprendentemente el compuesto 28 (el *orto*-QMP) mostró mejor comportamiento que el compuesto 36 (el *para*-QMP). La calidad de tinción (localización y separación de la señal) fue la misma para ambos compuestos, pero la intensidad de tinción fue mayor para el compuesto 28, incluso usando una concentración un 20 % menor que para el compuesto 36.

60

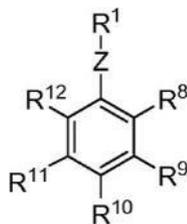
Los compuestos de *orto*-QMP ofrecen una mejora significativa del comportamiento de tinción IHQ, comportamiento de tinción de ISH y mejora en la estabilidad acuosa en comparación con cualquiera de los compuestos descritos previamente.

65 En vista de los muchos modos de realización posibles a los que se pueden aplicar los principios de la invención divulgada, se debe reconocer que los modos de realización ilustrados son solo ejemplos preferentes de la invención

y no se deben tomar como limitantes del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención se define por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, que tiene una fórmula



5

o una sal o solvato del mismo, en la que:

Z es O, S o NR<sup>a</sup> y R<sup>1</sup> es un fosfato, o ZR<sup>1</sup> es un fosfato;

10

R<sup>8</sup> es -C(LG)(R<sup>5</sup>)(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>);

R<sup>9</sup>, R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> son cada uno independientemente hidrógeno, halo, ciano, alifático, alcoxi, NO<sub>2</sub>, N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, arilo, haloalquilo, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup>, -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, -R<sup>3</sup>R<sup>4</sup> o dos grupos adyacentes conjuntamente forman un anillo alifático o anillo arilo;

15

R<sup>10</sup> es hidrógeno, halo, ciano, alifático, alcoxi, NO<sub>2</sub>, N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, arilo, haloalquilo, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup>, -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>, -R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, -C(LG)(R<sup>5</sup>)(R<sup>6</sup>) o con uno de R<sup>9</sup> o R<sup>11</sup> forman un anillo alifático o anillo arilo;

20

LG es un grupo saliente

R<sup>3</sup> es un conector o un enlace;

25

R<sup>4</sup> es un marcador detectable;

cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquilo inferior, haloalquilo inferior, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup> o -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>;

30

cada R<sup>6</sup> es independientemente hidrógeno, halo, ciano, alquilo inferior, haloalquilo inferior, -C(O)alquilo, -C(S)alquilo, -C(O)OH, -C(O)Oalquilo, -C(O)NHR<sup>c</sup> o -C(O)N(R<sup>c</sup>)<sub>2</sub>;

R<sup>a</sup> es hidrógeno o alifático;

35

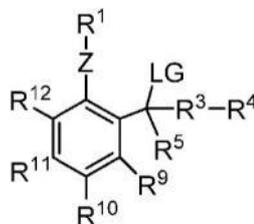
cada R<sup>c</sup> independientemente es hidrógeno, arilo, alifático o heteroalifático, o dos restos R<sup>c</sup> conjuntamente forman un anillo heteroalifático; y

al menos uno de R<sup>8</sup> y R<sup>10</sup> comprende LG, y al menos uno de R<sup>8</sup> y R<sup>10</sup> comprende R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>; y

40

si LG es halo, entonces R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> no son halo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene una fórmula



45

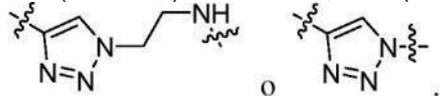
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que Z es O.
4. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que ZR<sup>1</sup> es -OP(O)(OH)<sub>2</sub>, o una sal del mismo.
- 50 5. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que LG es haluro, éster de sulfato, carboxilato, éster inorgánico, tiolato, amina, ariloxi, alcoxi o heteroarilo, opcionalmente en el que:

LG es fluoruro, cloruro, acido, acetato, metoxi, etoxi, isopropoxi, fenóxido,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CX}_3$ ,  $-\text{OC}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{N}_2^+$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NC}_6\text{H}_5^+$ ,  $-\text{O}$ -alquilo,  $-\text{OC}(\text{O})$ alquilo,  $-\text{OC}(\text{O})\text{H}$ ,  $-\text{N}(\text{R}^b)_3^+$  o 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano;

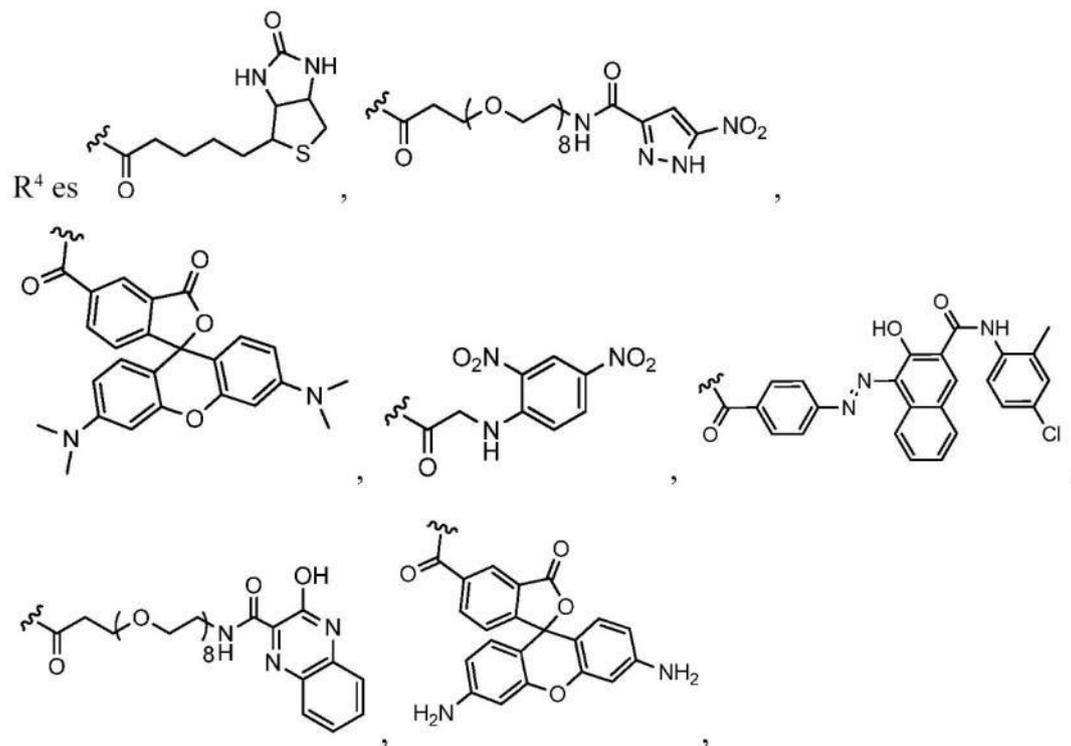
5 cada X independientemente es fluoro, cloro, bromo o yodo; y

cada  $\text{R}^b$  independientemente es hidrógeno o alquilo inferior, o dos restos  $\text{R}^b$  conjuntamente forman un anillo heteroalifático.

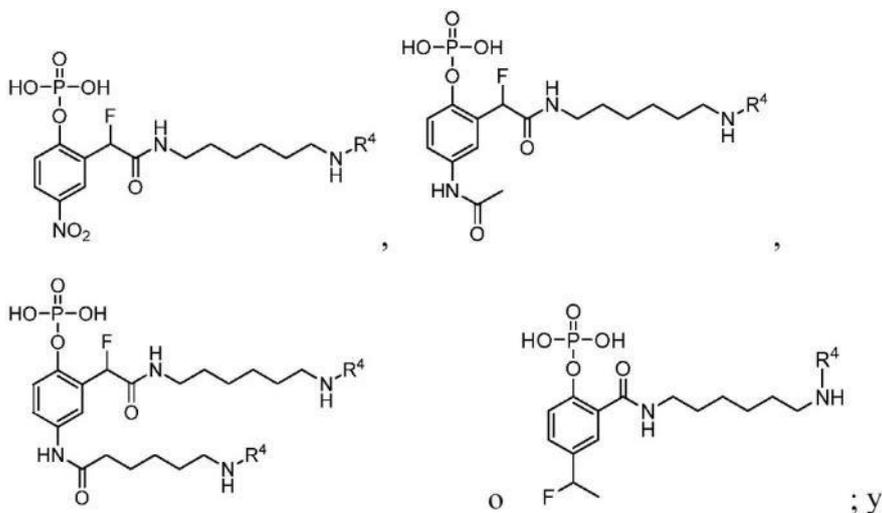
10 6. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que  $\text{R}^3$  es  $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ ,  $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ ,  
 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ ,  $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_n\text{O}-$ ,  
 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{S}-$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{S}-$ ,  $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_n\text{S}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ ,  
 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$  o  $-\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_n\text{NH}-$ , donde cada n independientemente es 1, 2,  
 15 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o el compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que  $\text{R}^3$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}-$ ,  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}-$ ,  $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_6\text{NH}-$ ,  $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_6\text{NHC}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_4\text{NH}-$ ,



20 7. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, en el que  $\text{R}^4$  es un cromógeno, un fluoróforo, un luminóforo, un hapteno o una combinación de los mismos, opcionalmente en el que







R<sup>4</sup> es un cromógeno, un fluoróforo, un luminóforo o un hapteno.

- 5 9. Un procedimiento de detección de una primera diana en una muestra biológica, que comprende:
- poner en contacto la muestra biológica con una primera sonda de detección específica para la primera diana;
- 10 poner en contacto la muestra biológica con un primer conjugado marcador, que comprende una primera enzima;
- 15 poner en contacto la muestra biológica con un primer precursor de análogo de quinona metida que comprende un primer grupo de reconocimiento de enzima y un primer marcador detectable, en el que el primer precursor de análogo de quinona metida es un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y en el que la primera enzima escinde el primer grupo de reconocimiento de enzima, convirtiendo de este modo el primer precursor de análogo de quinona metida en un primer análogo de quinona metida reactiva que se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directamente en la primera diana, poner en contacto la muestra biológica que comprende
- 20 (i) poner en contacto la muestra biológica con el primer precursor de análogo de quinona metida a una concentración de precursor eficaz para dar un nivel deseado de amplificación;
- (ii) poner en contacto la muestra biológica con el primer precursor de análogo de quinona metida a un pH que es de más de 7 a 14;
- 25 (iii) poner en contacto la muestra biológica con el primer precursor de análogo de quinona metida en presencia de una sal a una concentración de sal que es de 0,1 M a 2 M;
- (iv) poner en contacto la muestra biológica con un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8; o
- 30 (v) cualquier combinación de los mismos; y
- detectar la primera diana detectando el primer marcador detectable.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la sal es cloruro de magnesio.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la concentración del primer precursor de análogo de quinona metida es de más de cero a 1 mM, opcionalmente en el que la concentración del primer precursor de análogo de quinona metida es de 50 nM a 100 μM, o de 100 nM a 1 μM.
- 40 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que la muestra biológica comprende tejido incluido en parafina fijado en formol.
- 45 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que la primera sonda de detección comprende un oligonucleótido, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, opcionalmente en el que la primera sonda de detección comprende un oligonucleótido marcado con hapteno.

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el primer conjugado marcador comprende un anticuerpo acoplado a la primera enzima, opcionalmente en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-especie o anti-hapteno.
- 5 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en el que el primer conjugado marcador se asocia directa o indirectamente con la primera sonda de detección.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la primera sonda de detección comprende un primer anticuerpo anti-especie y la primera sonda marcadora comprende un segundo anticuerpo anti-especie.
- 10 17. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la primera sonda de detección comprende un hapteno y la primera sonda marcadora comprende un anticuerpo anti-hapteno.
18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9-17, en el que la primera enzima es una fosfatasa, opcionalmente en el que la primera enzima es una fosfatasa alcalina.
- 15 19. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además:
- 20 poner en contacto la muestra biológica con una segunda sonda de detección específica para una segunda diana;
- poner en contacto la muestra biológica con un segundo conjugado marcador, que comprende una segunda enzima;
- 25 poner en contacto la muestra biológica con un segundo precursor de análogo de quinona metida que comprende un segundo grupo de reconocimiento de enzima y un segundo marcador detectable, en el que el segundo precursor de análogo de quinona metida es un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y en el que la segunda enzima escinde el segundo grupo de reconocimiento de enzima,
- 30 convirtiendo de este modo el segundo precursor de análogo de quinona metida en un segundo análogo de quinona metida reactiva que se une covalentemente a la muestra biológica de forma proximal a o directamente en la segunda diana; y
- detectar la segunda diana detectando el segundo marcador detectable.
- 35 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la primera enzima y segunda enzima son enzimas diferentes, y la primera enzima reacciona selectivamente con el primer precursor de análogo de quinona metida, y la segunda enzima reacciona selectivamente con el segundo precursor de análogo de quinona metida.
- 40 21. Un kit, que comprende:
- un conjugado enzima-anticuerpo;
- un precursor de análogo de quinona metida;
- 45 una mezcla de disolventes; y
- una solución de ajuste de pH,
- 50 en el que el precursor de análogo de quinona metida es un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
22. El kit de la reivindicación 21, en el que:
- 55 la mezcla de disolventes comprende DMSO y un tampón glicina a pH 2;
- la solución de ajuste de pH es un tampón Tris con un intervalo de pH de desde pH 8 a pH 10; y
- 60 que comprende además cloruro de magnesio a una concentración de desde 0,5 M a 1,25 M.

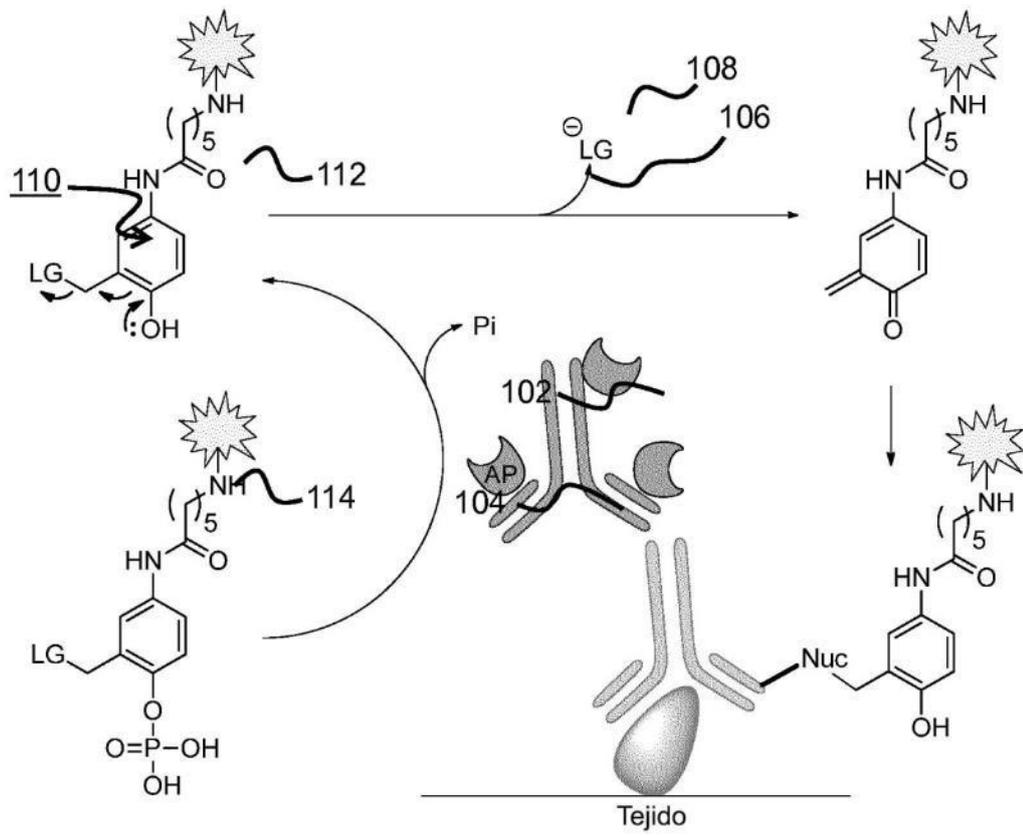


FIG. 1

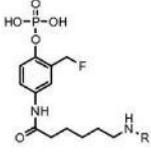
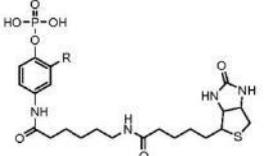
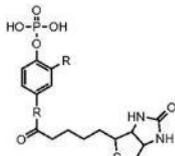
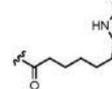
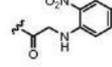
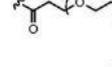
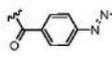
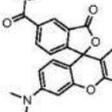
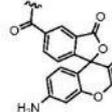
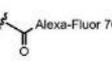
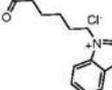
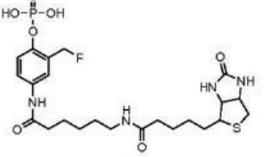
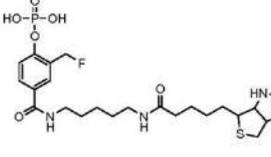
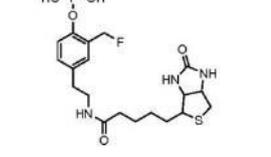
 <p><b>Marcador detectable</b></p>	 <p><b>Grupos salientes</b></p>	 <p><b>Grupos conectores</b></p>
<p>R =</p> <ul style="list-style-type: none"> <li> Biotina (7)</li> <li> DNP</li> <li> NP</li> <li> Fast Red</li> <li> TAMRA</li> <li> Rhod 110</li> <li> Alexa-Fluor 700 AF 700</li> <li> Alexa-Fluor 750 AF750</li> <li> Cy5</li> </ul>	<p>R = -CH<sub>2</sub>F      Monofluoro (14)</p> <p>-CHF<sub>2</sub>      Difluoro</p> <p>-CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>      Metoxi</p> <p>-CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>      Acetato</p> <p> Piridina</p> <p> DABCO</p> <p> Trietilamina</p> <p>-CH<sub>2</sub>OH      Monohidroxi</p> <p> Carbamato</p>	 <p>Anilina-amida (7)</p>  <p>Benzoico-amida (21)</p>  <p>Tiramida (14)</p>

FIG. 2(A)

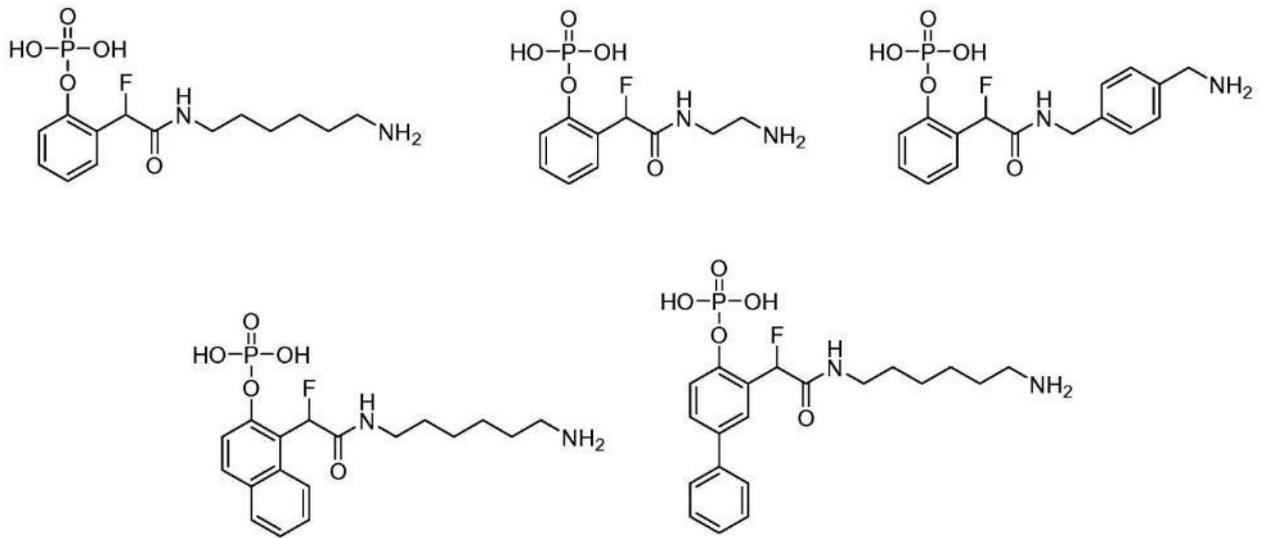


FIG. 2(B)

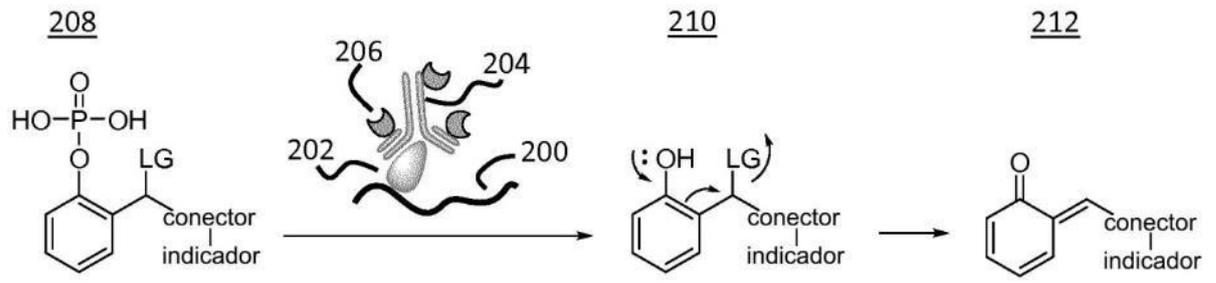


FIG. 3(A)

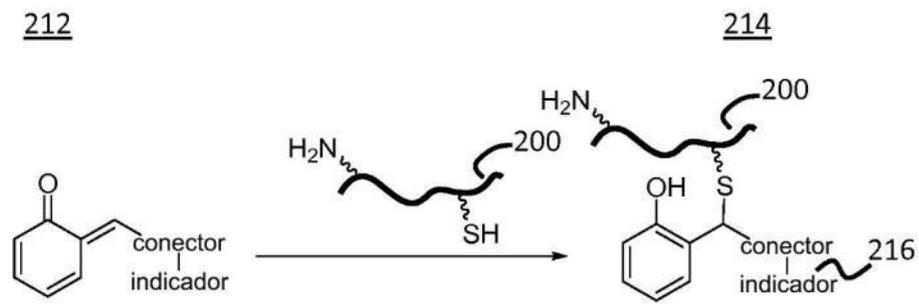


FIG. 3(B)

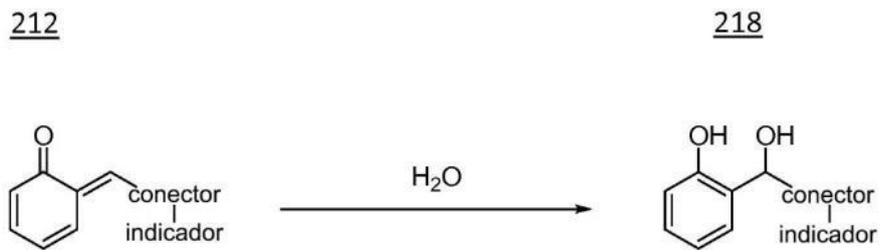


FIG. 3(C)

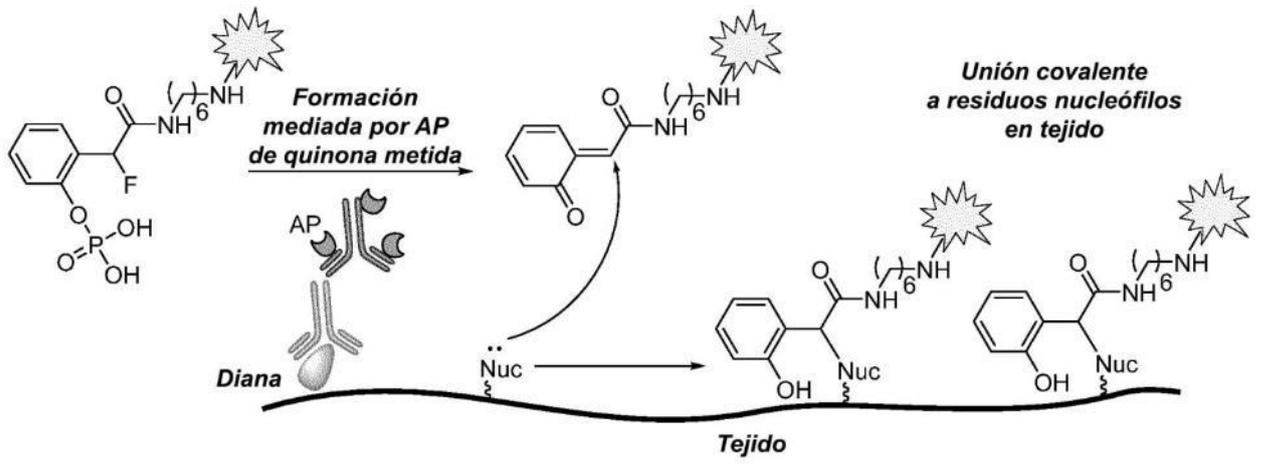


FIG. 4

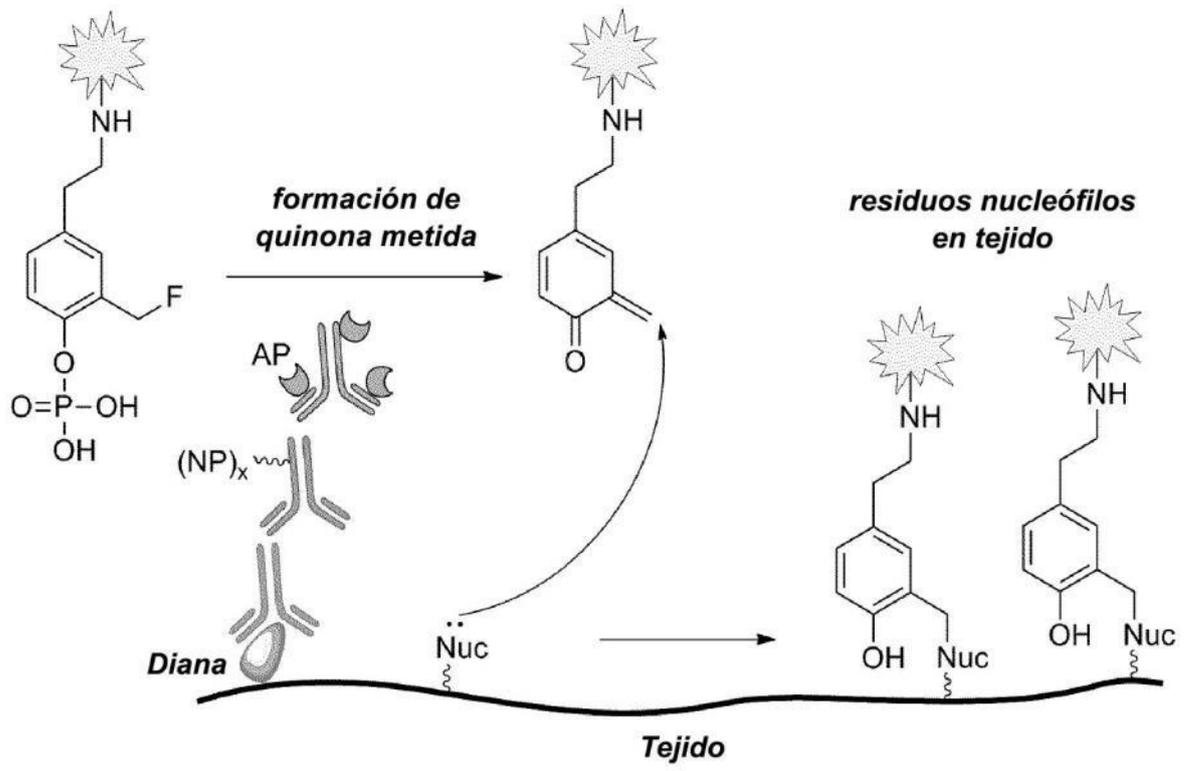
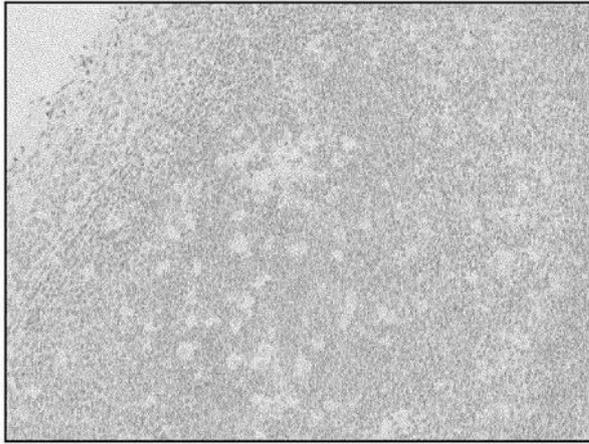
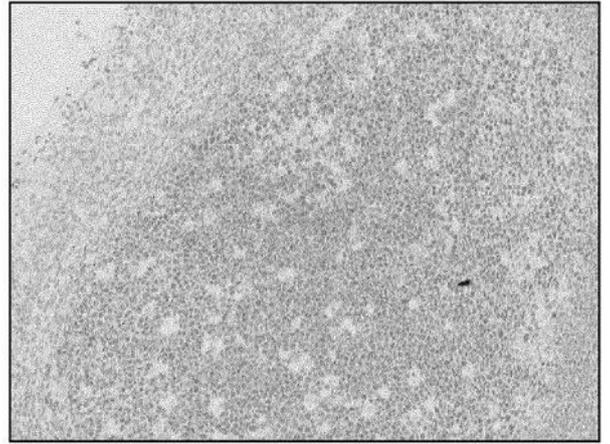


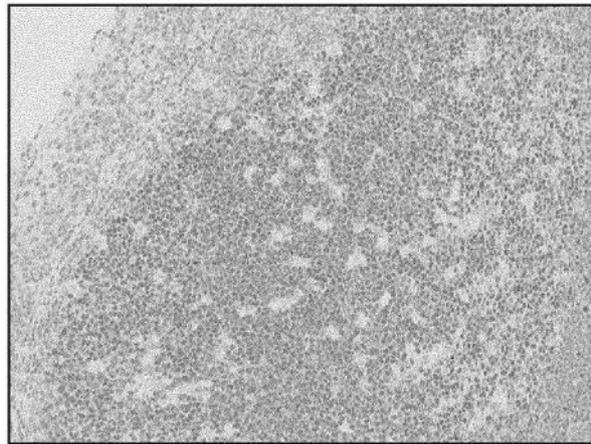
FIG. 5



**6A**

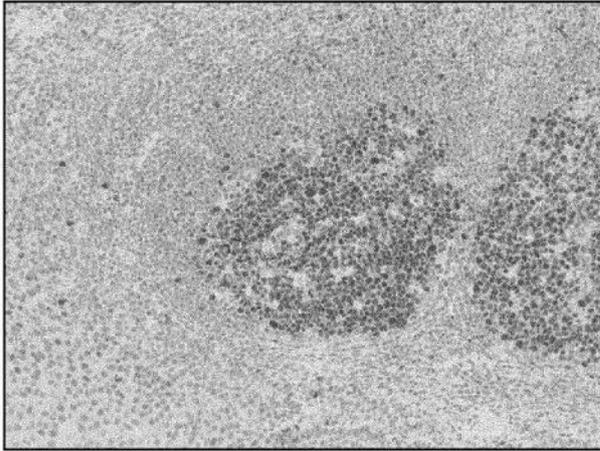


**6B**

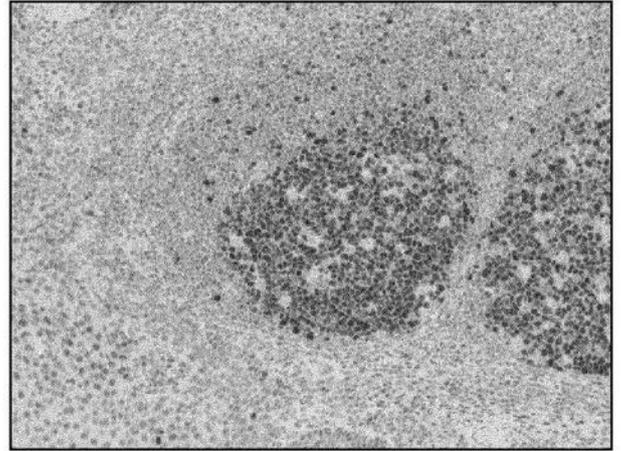


**6C**

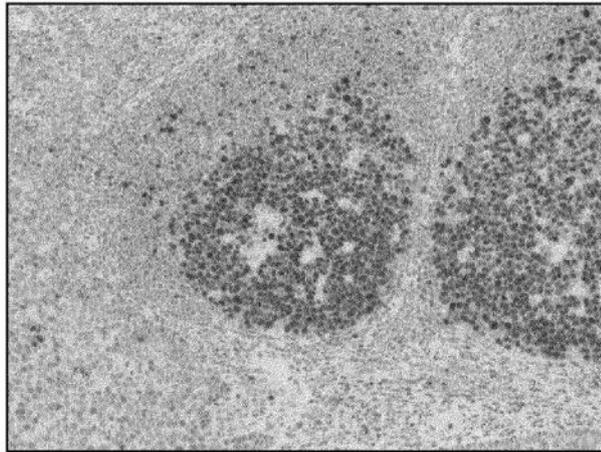
**FIG. 6**



**7A**



**7B**



**7C**

**FIG. 7**

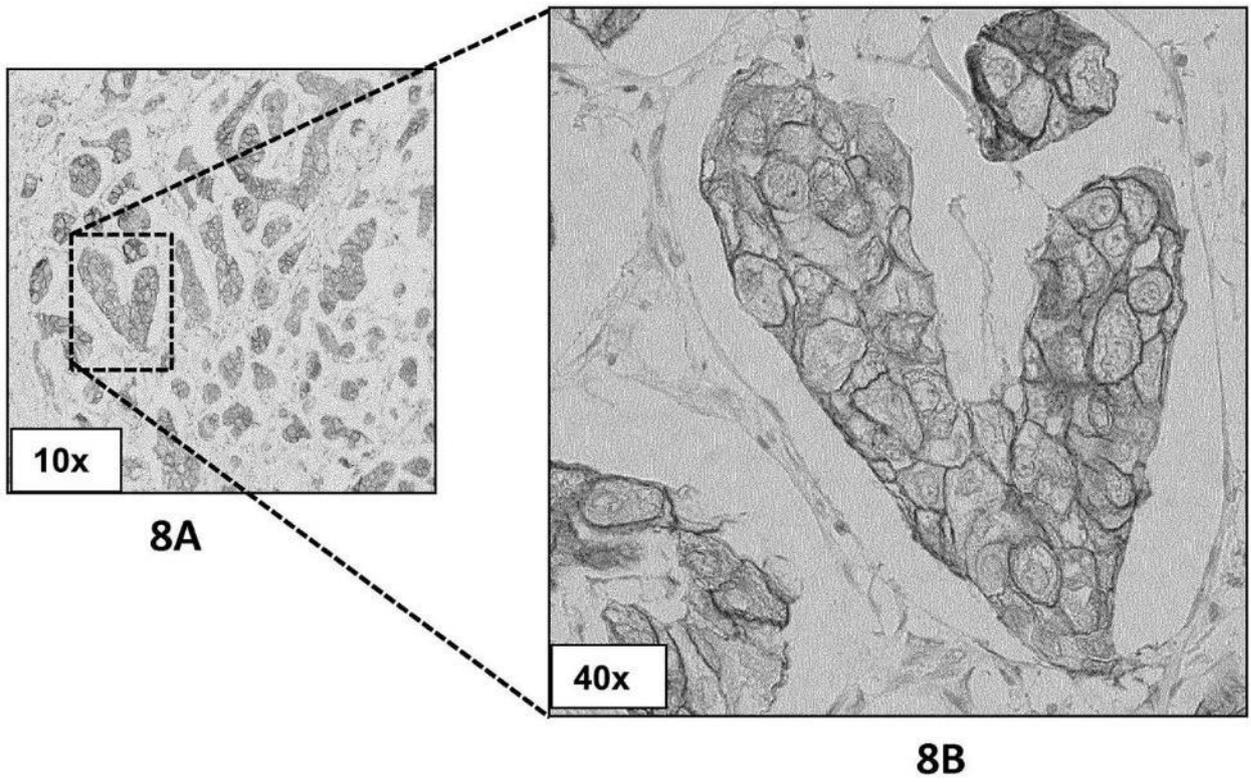


FIG. 8

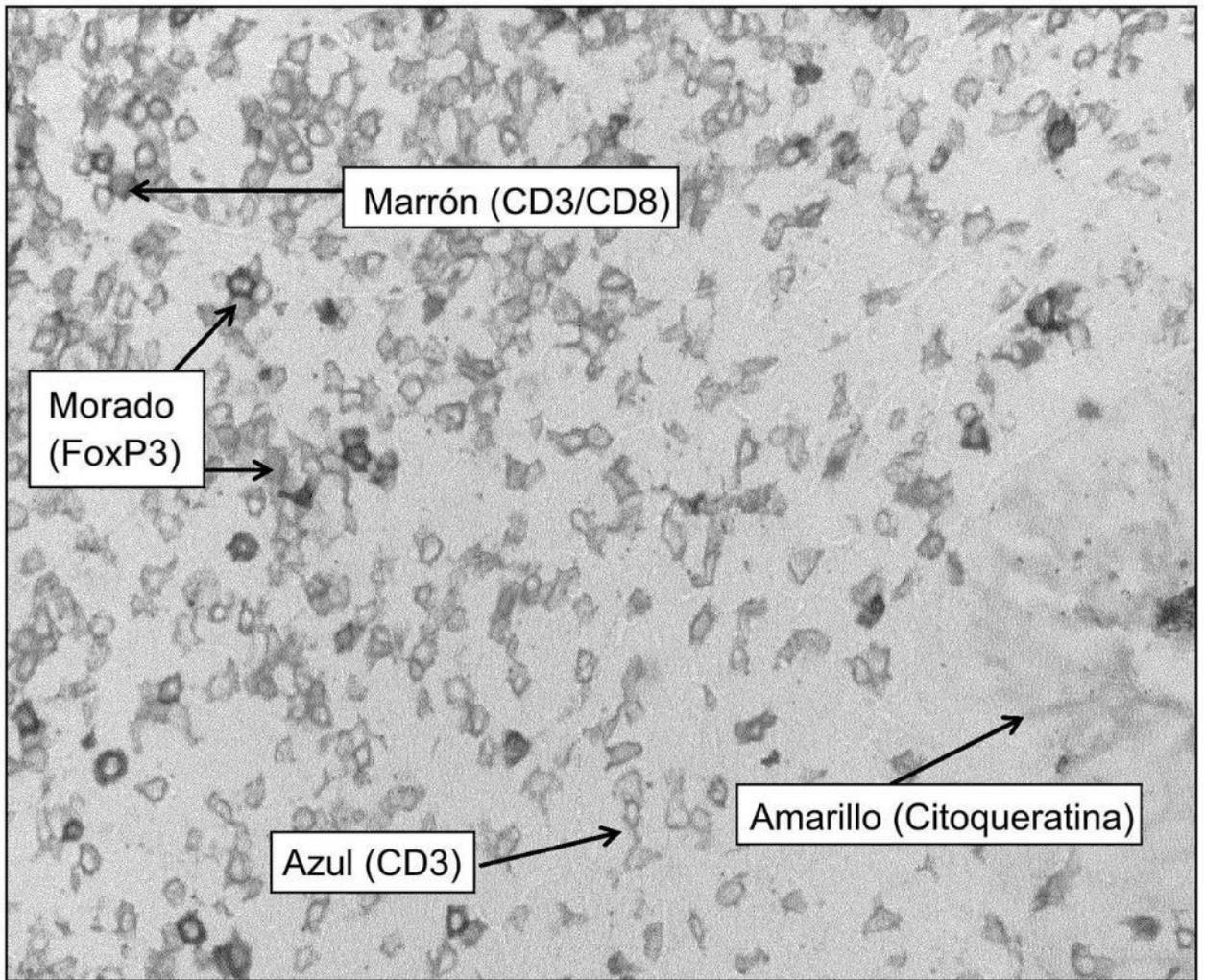


FIG. 9

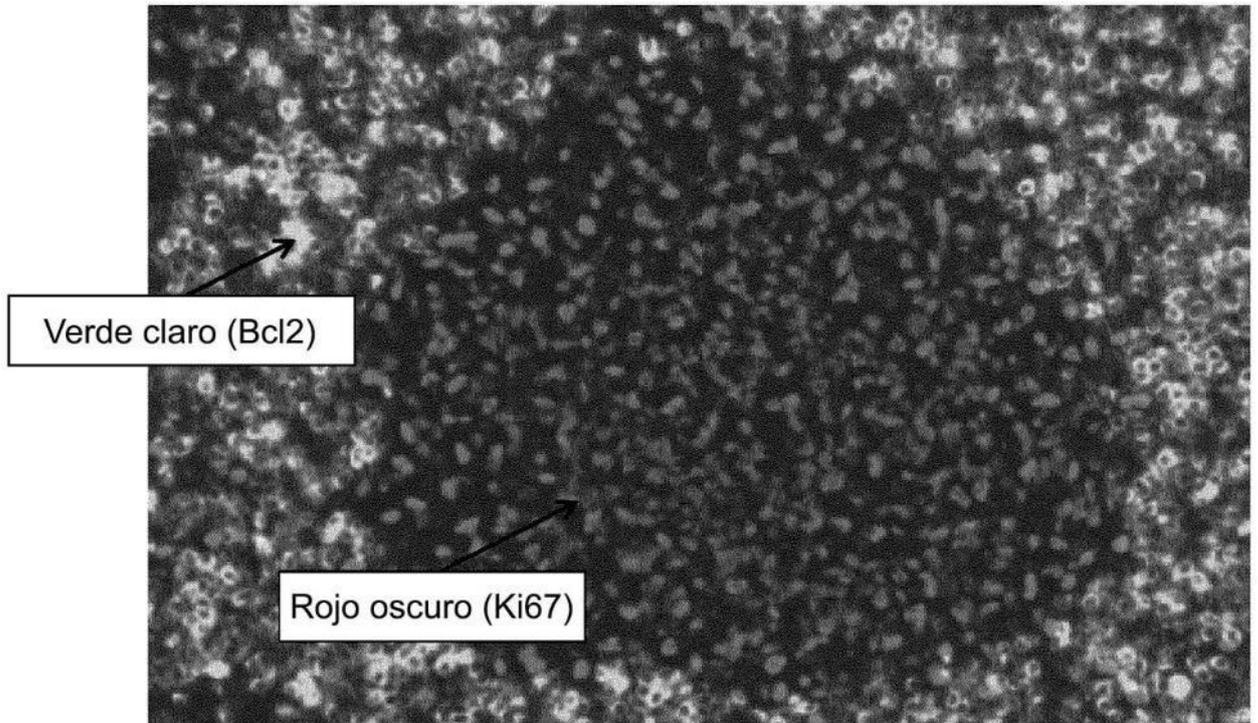


FIG. 10

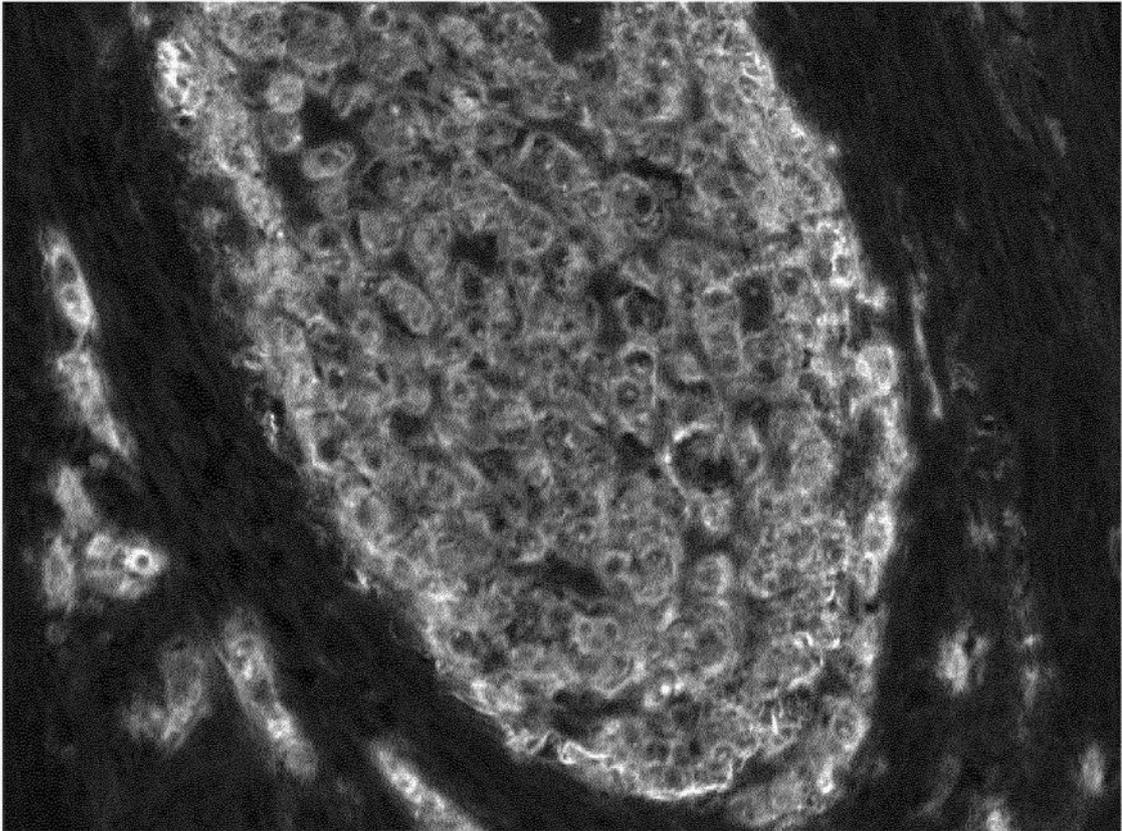


FIG. 11

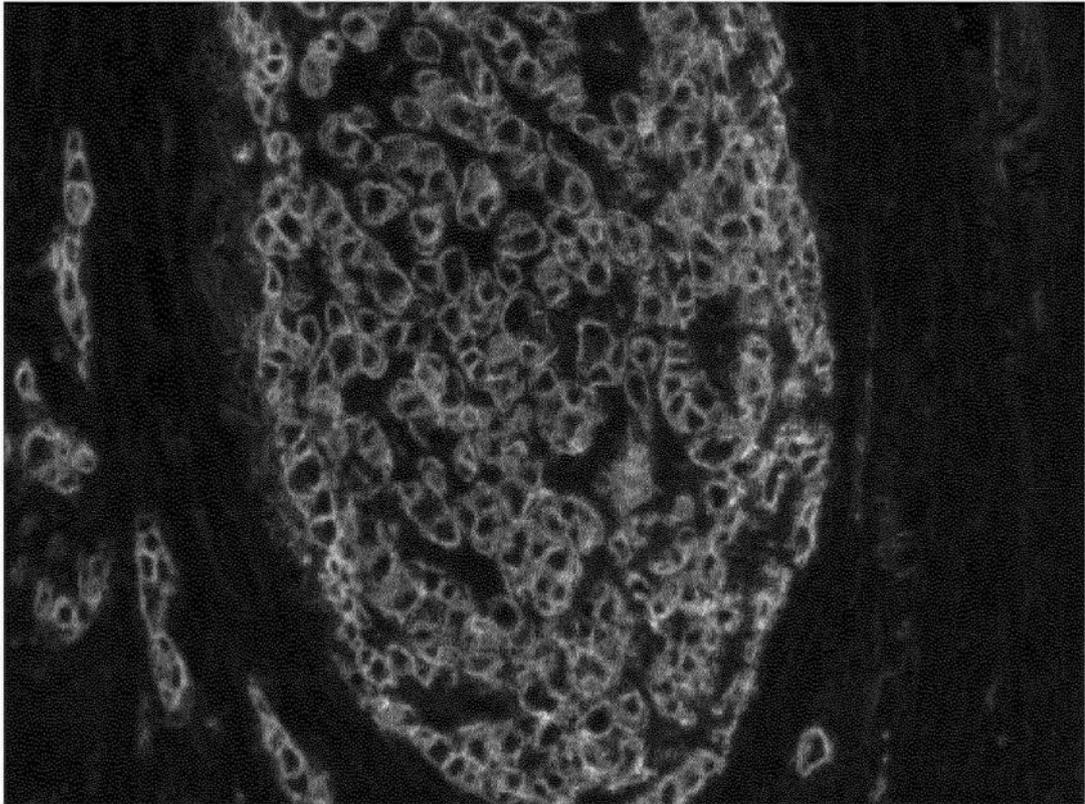


FIG. 12

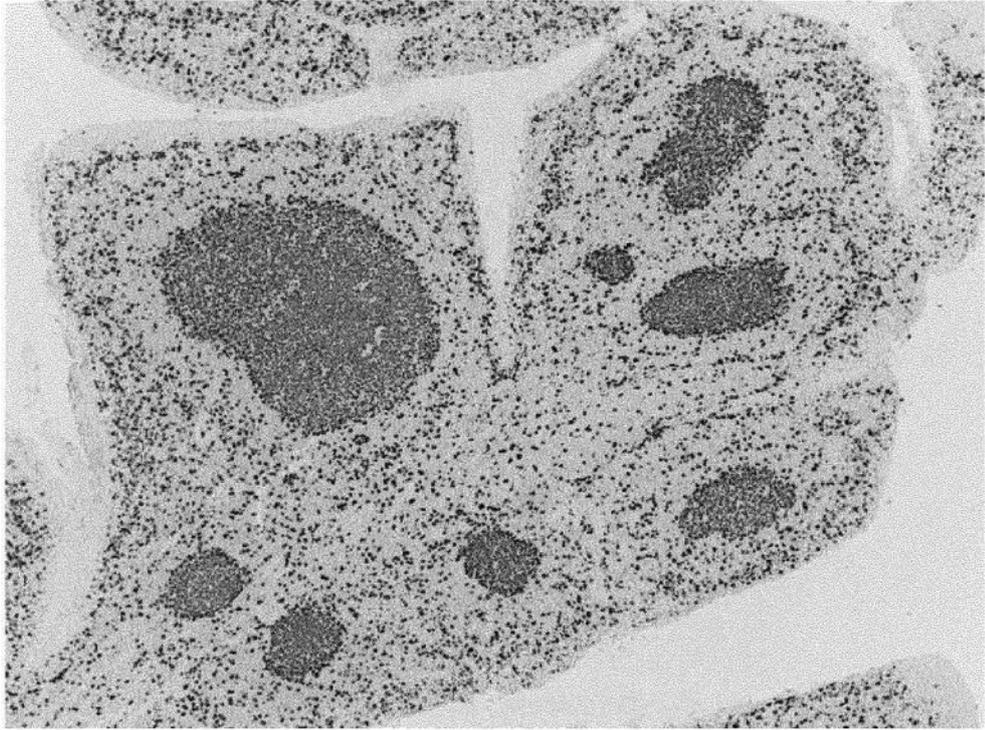


FIG. 13(A)

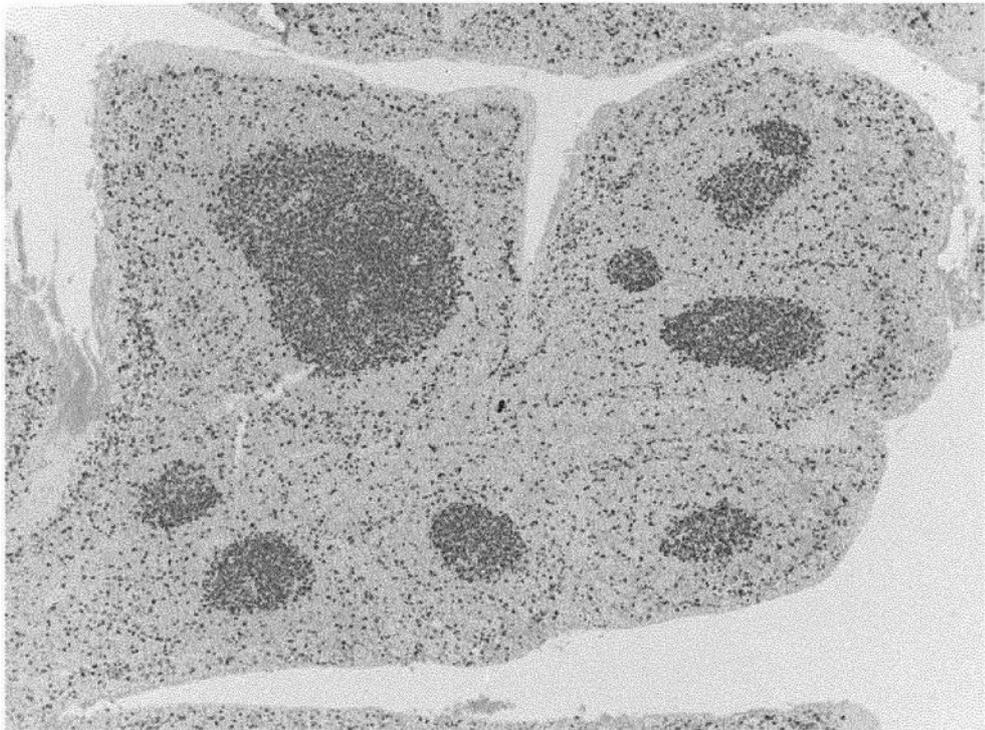


FIG. 13(B)

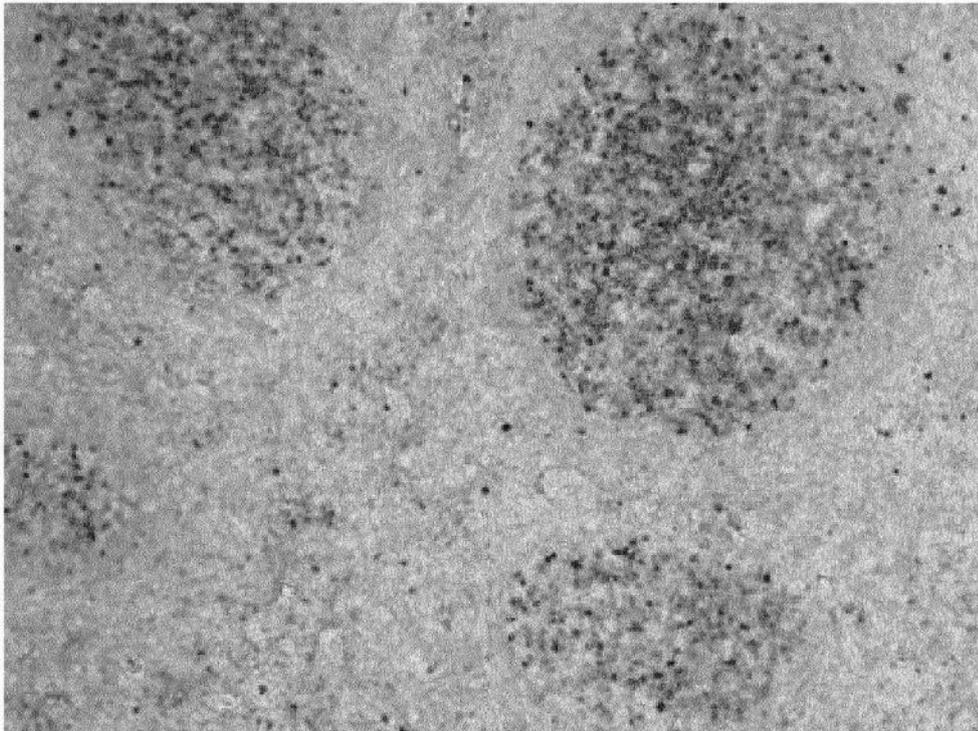


FIG. 14(A)

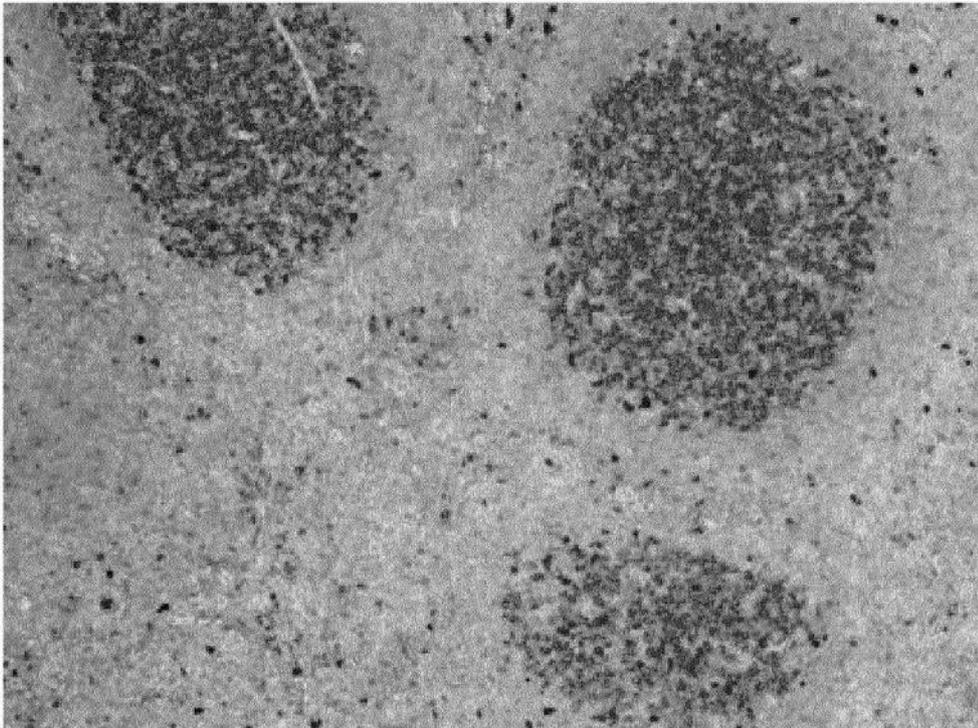


FIG. 14(B)



FIG. 14(C)

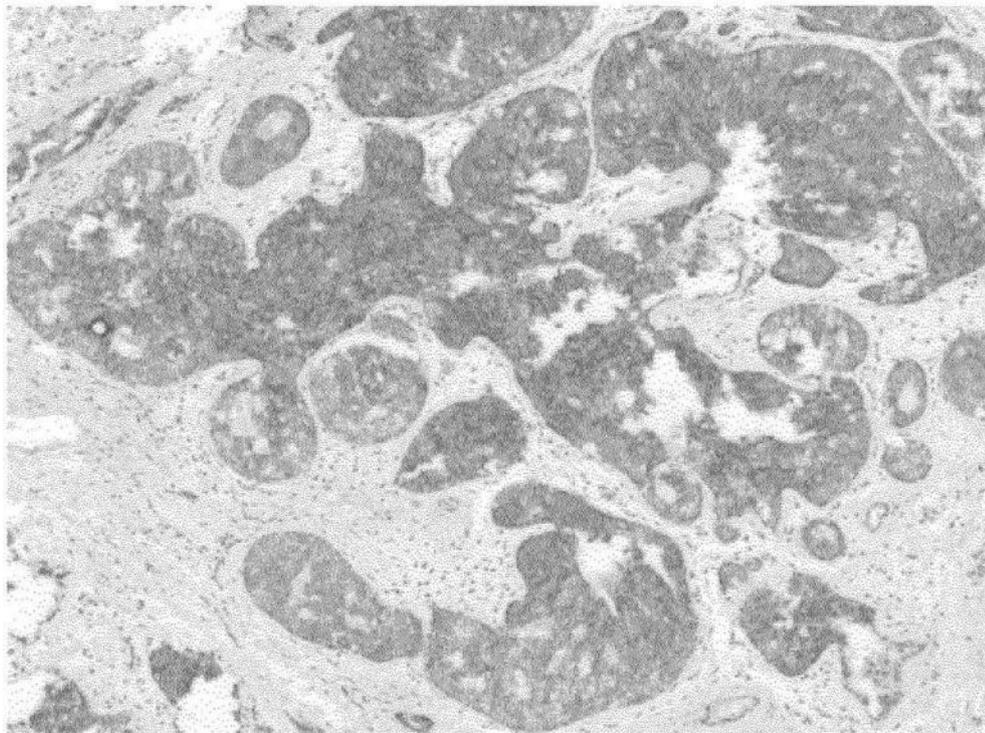


FIG. 14(D)

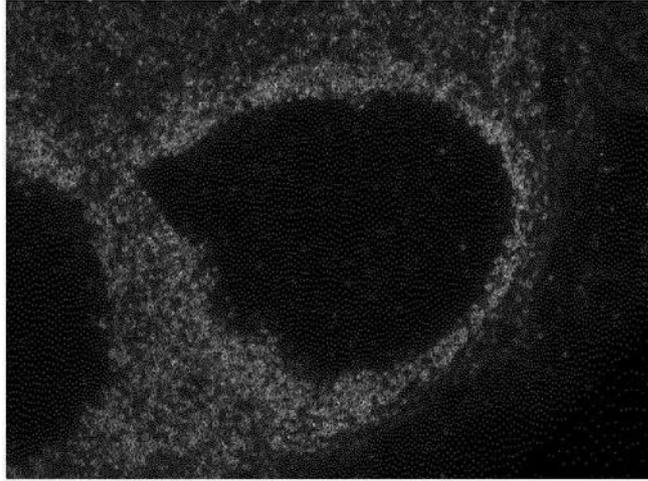


FIG. 15(A)

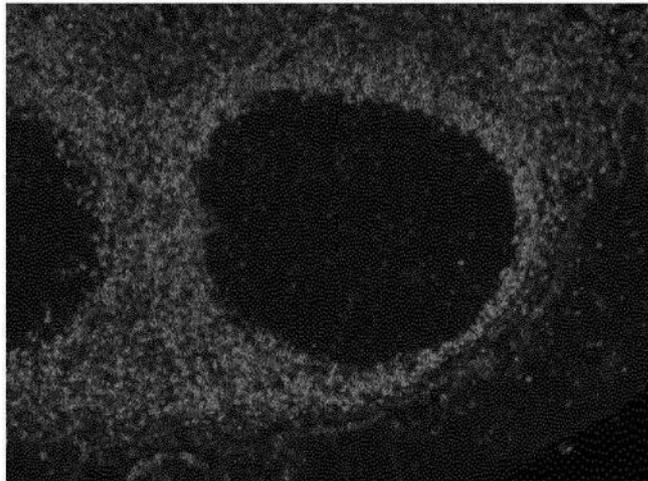


FIG. 15(B)

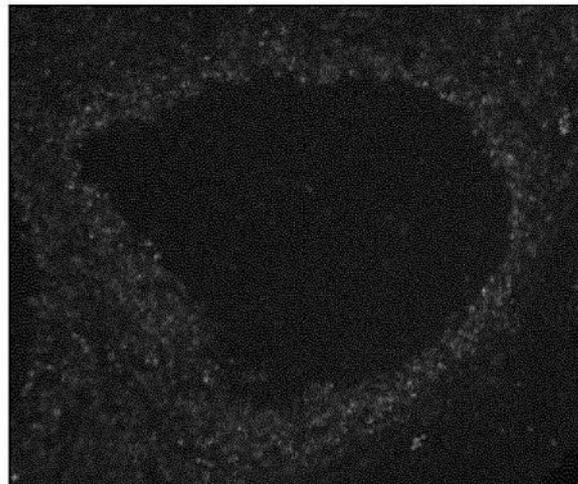


FIG. 15(C)

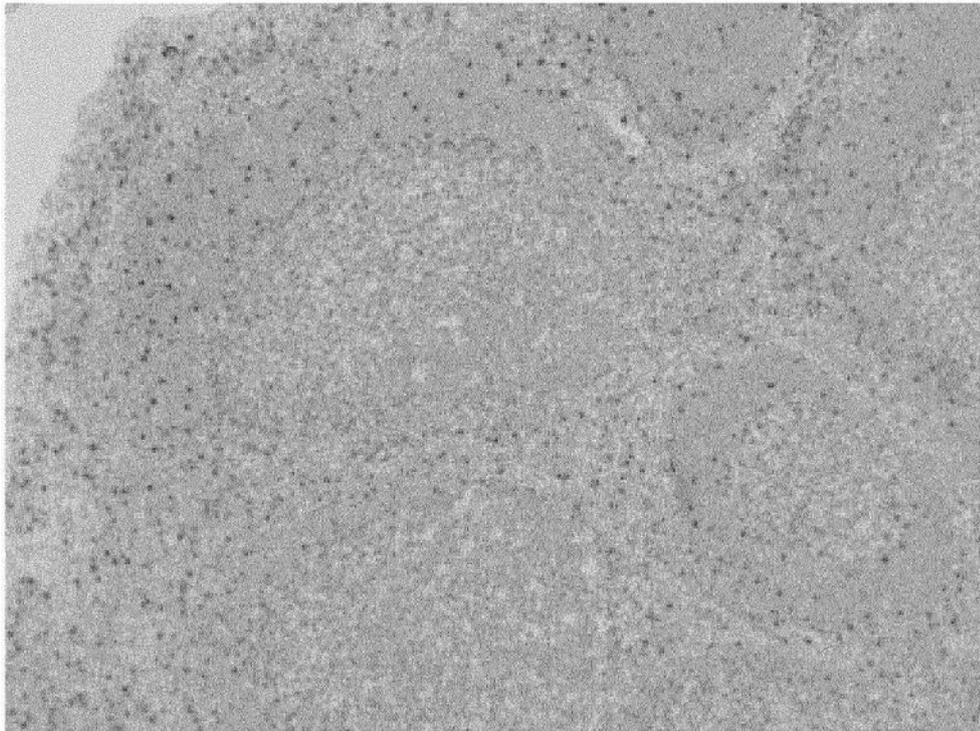


FIG. 16(A)

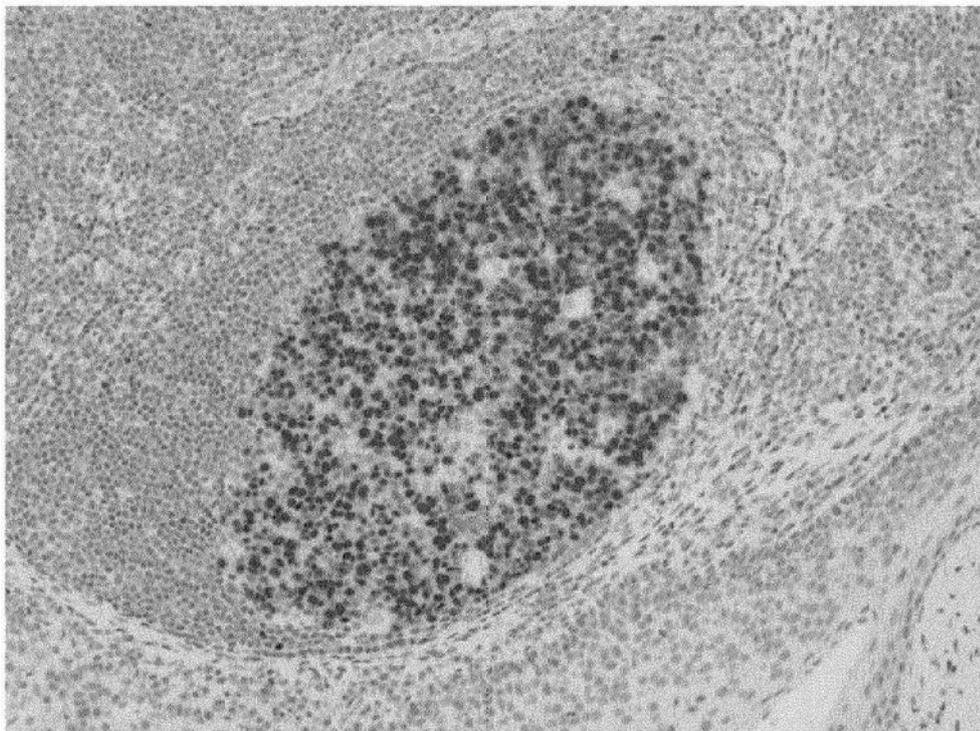


FIG. 16(B)

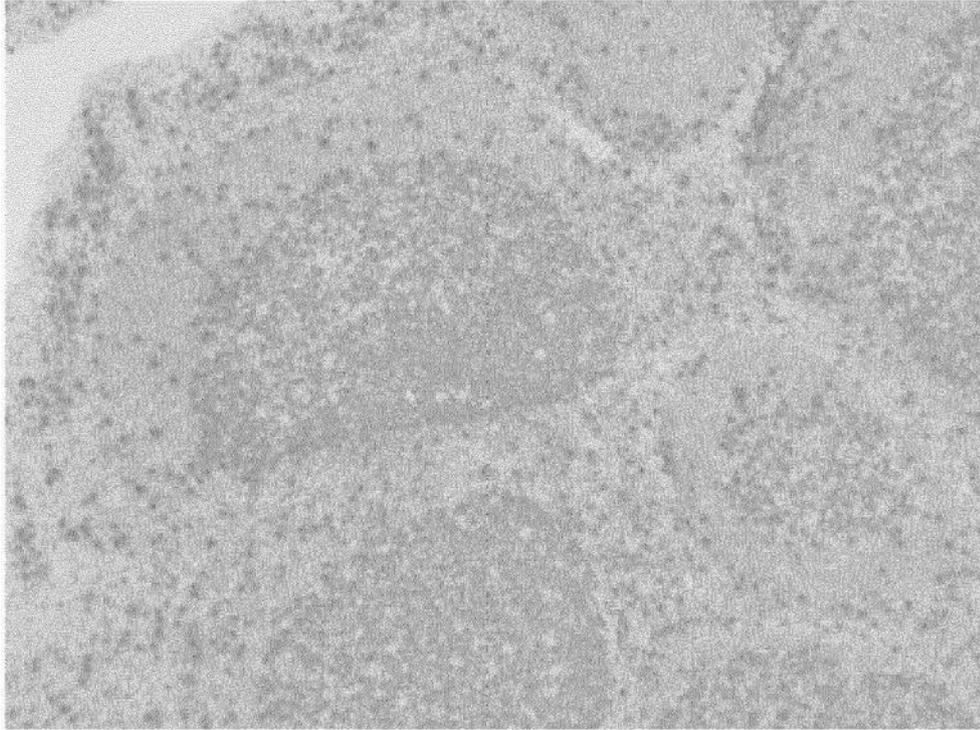


FIG. 16(C)

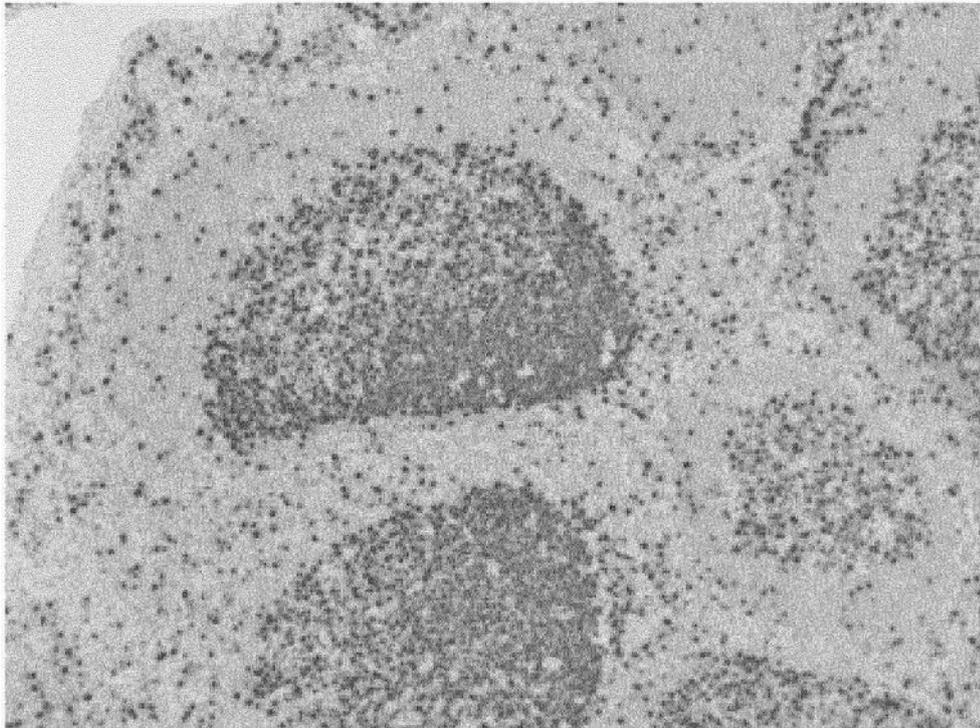


FIG. 16(D)

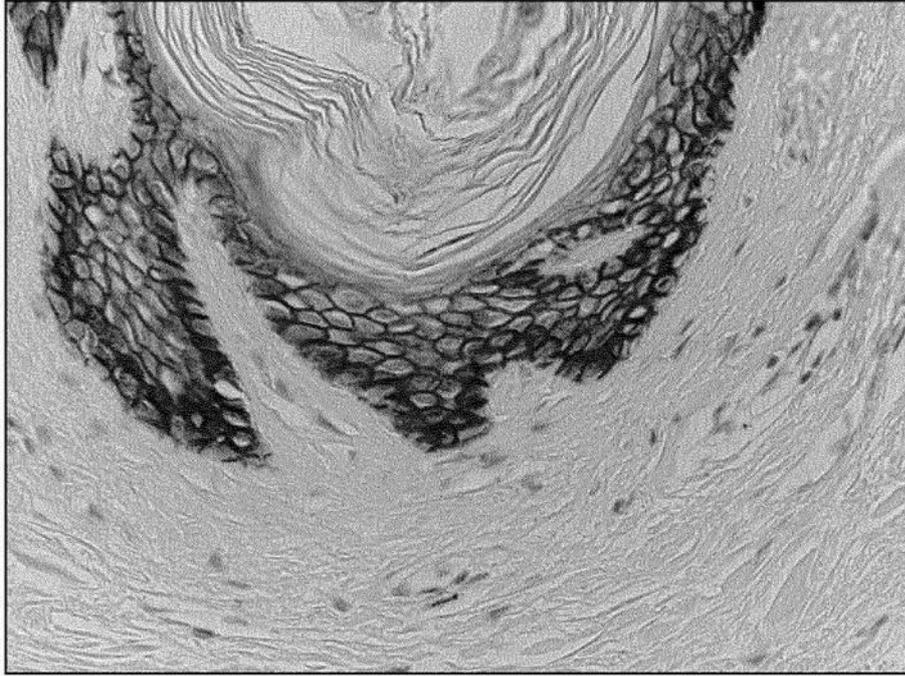


FIG. 17(A)

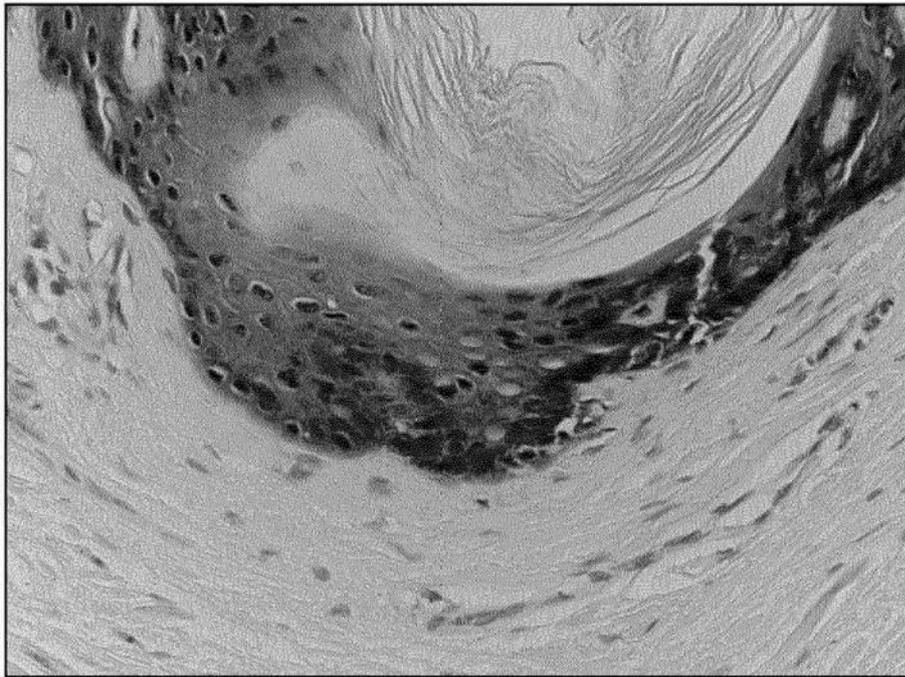


FIG. 17(B)

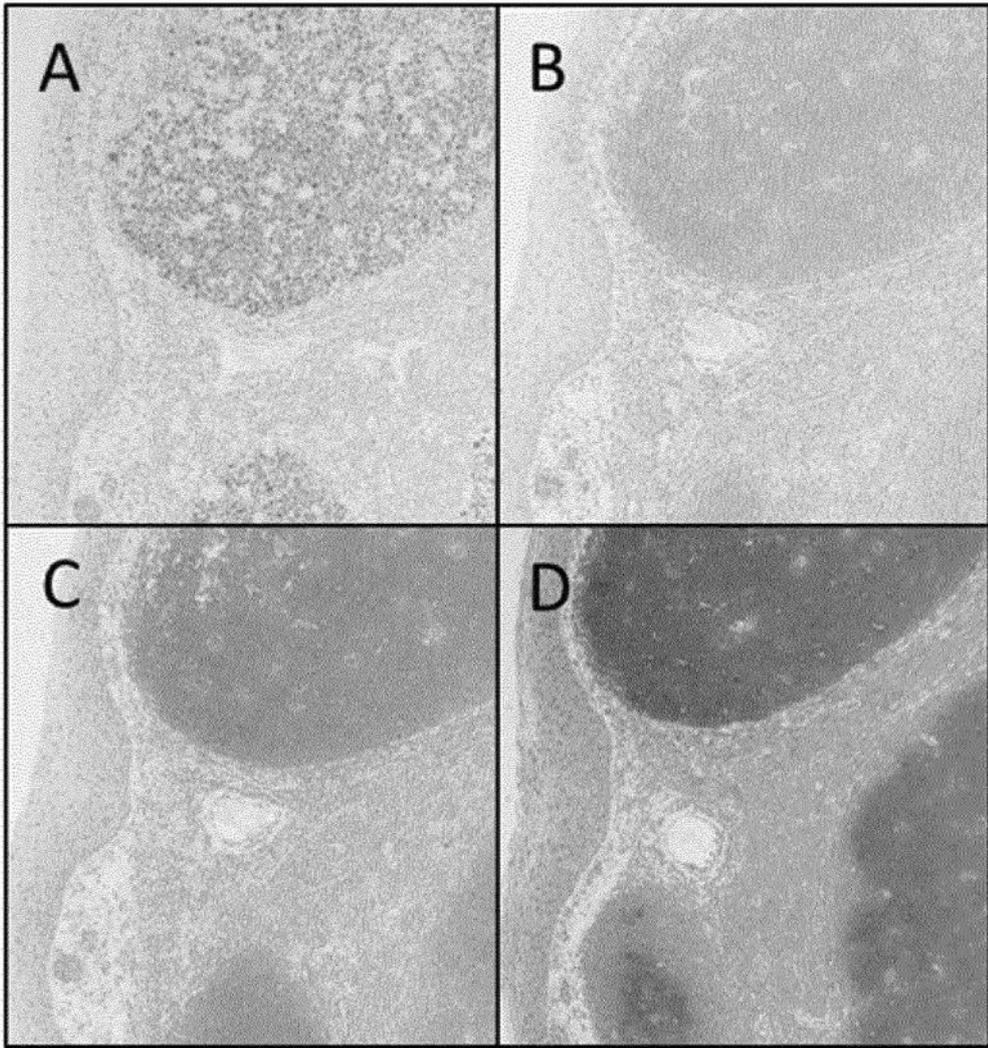


FIG. 18

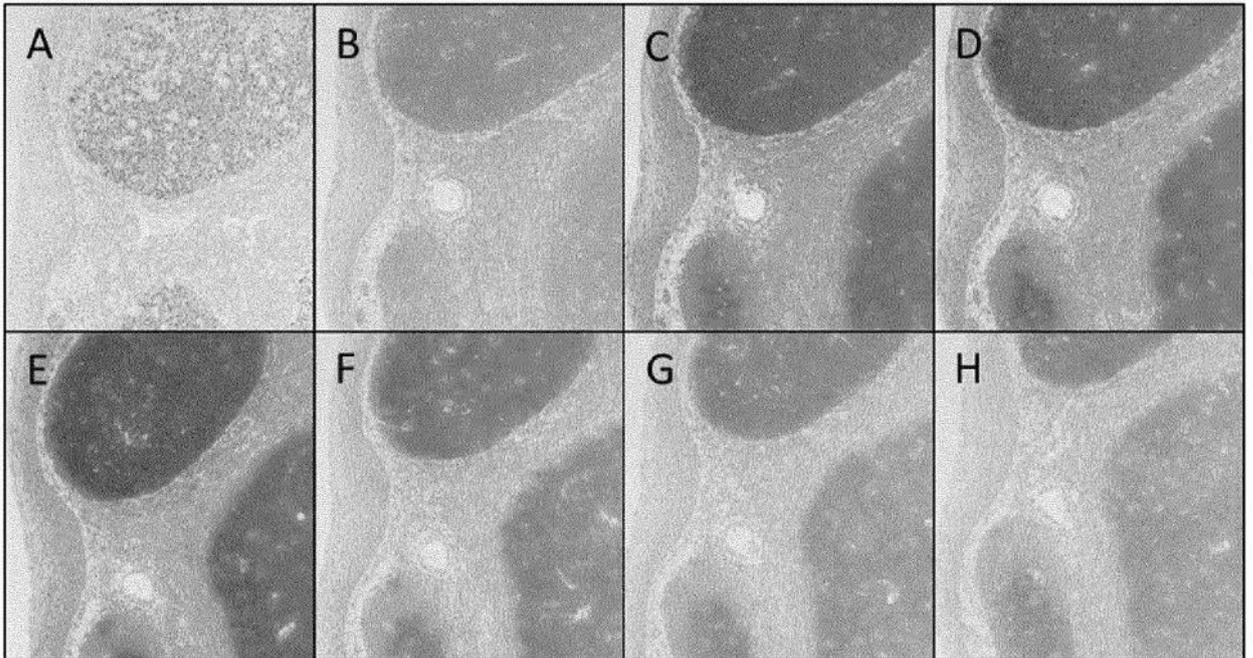


FIG. 19

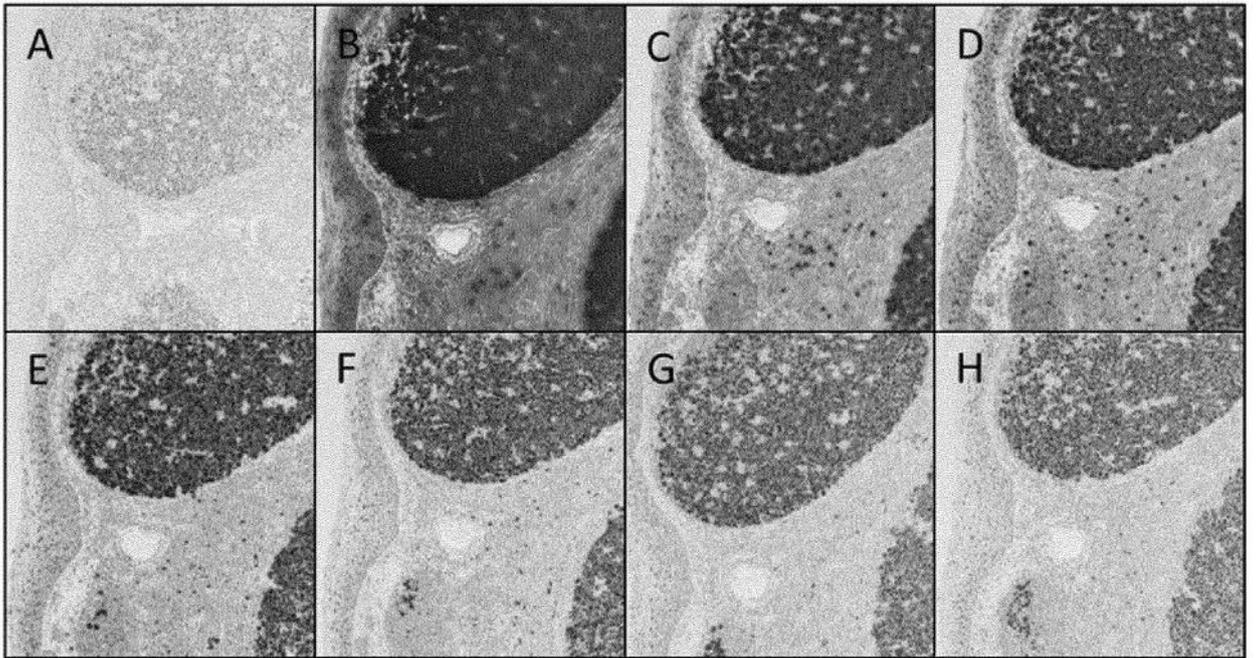


FIG. 20

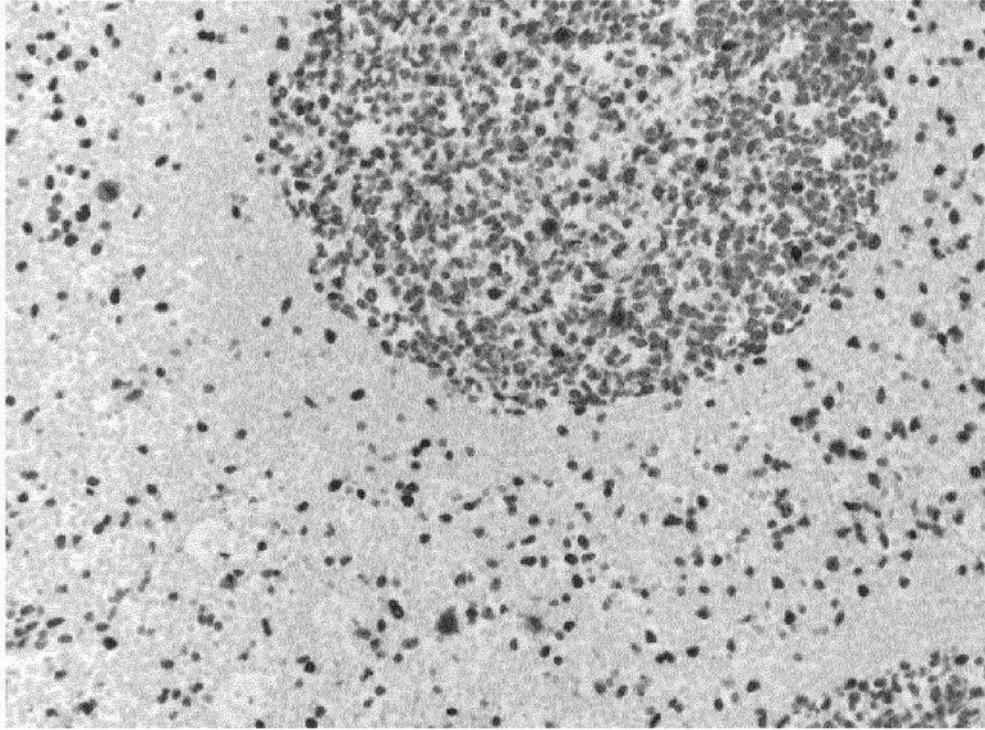


FIG. 21(A)

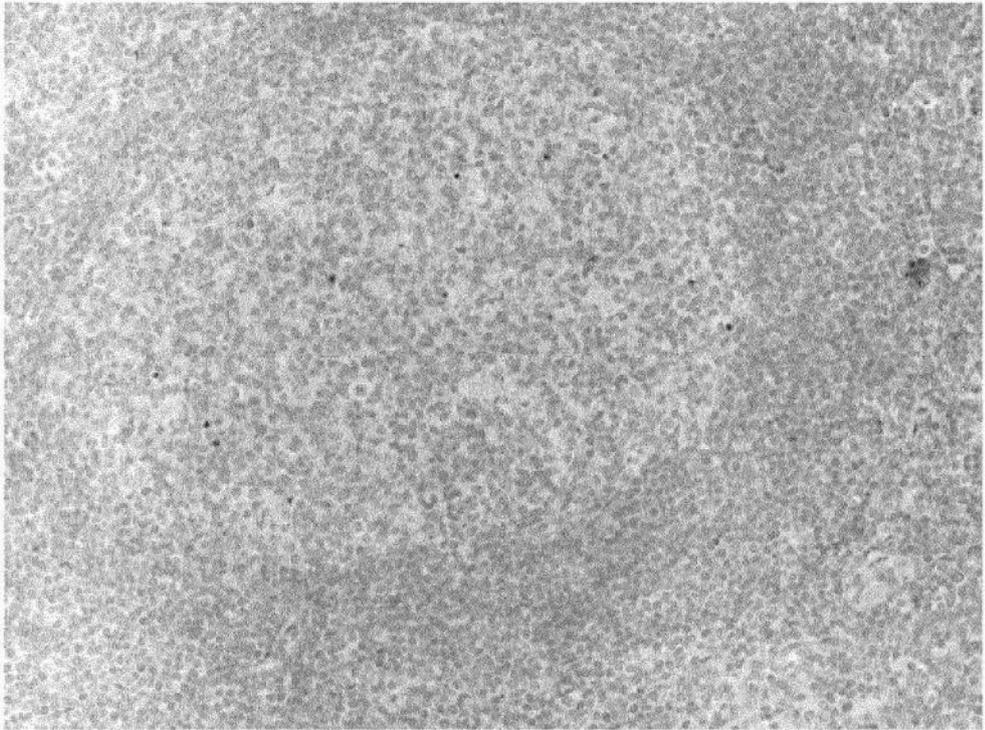


FIG. 21(B)

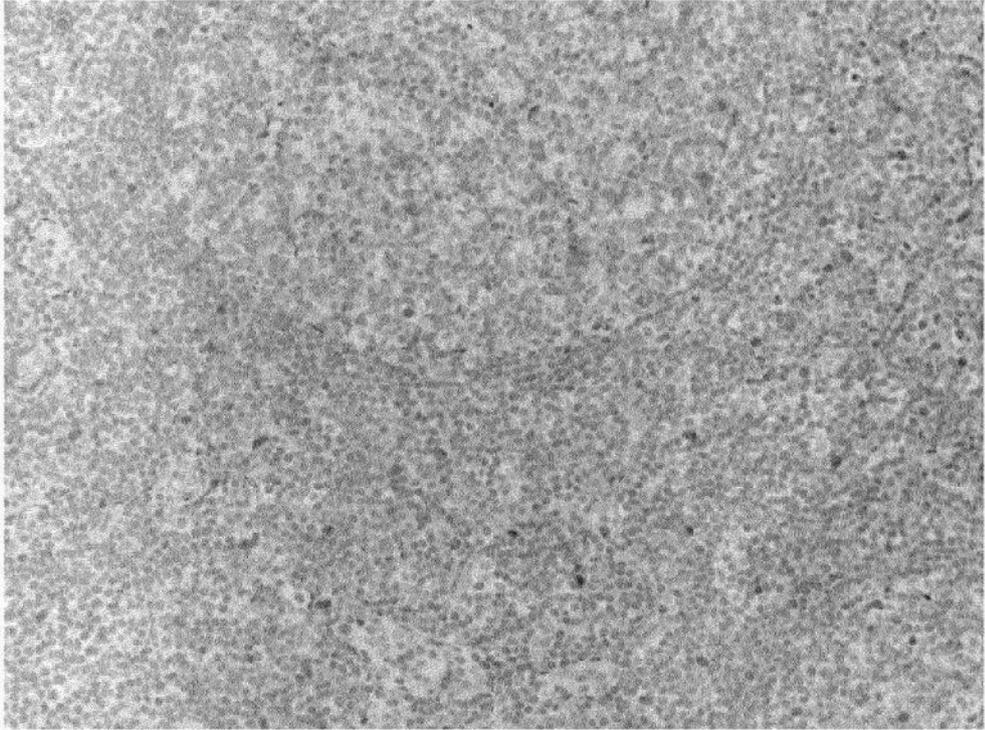


FIG. 21(C)

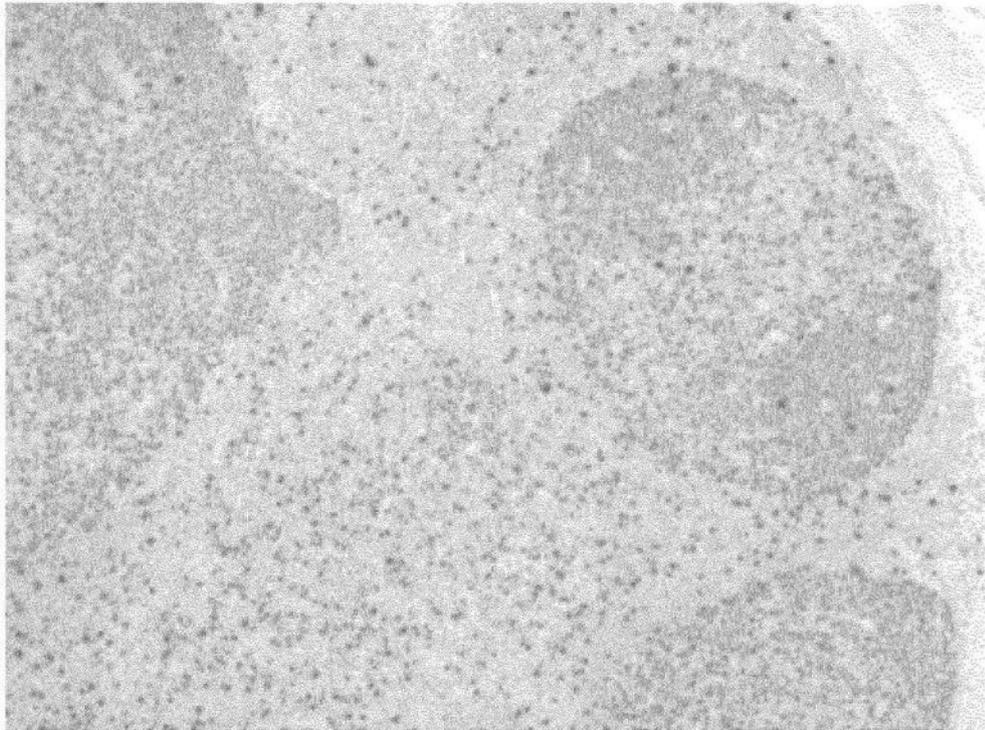


FIG. 21(D)

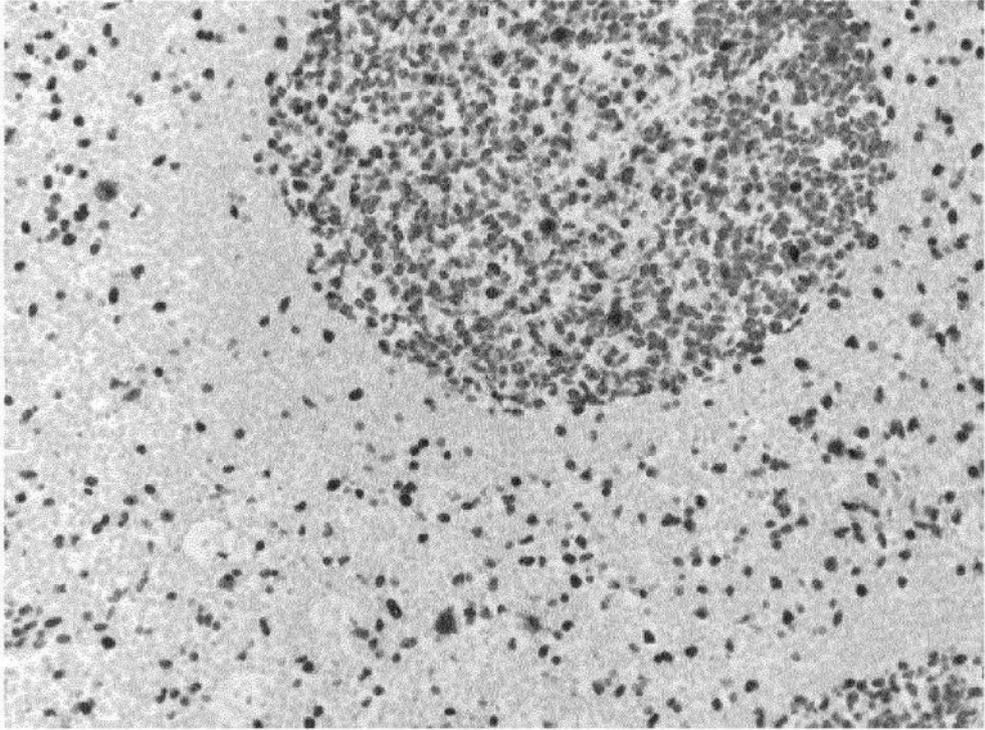


FIG. 22(A)

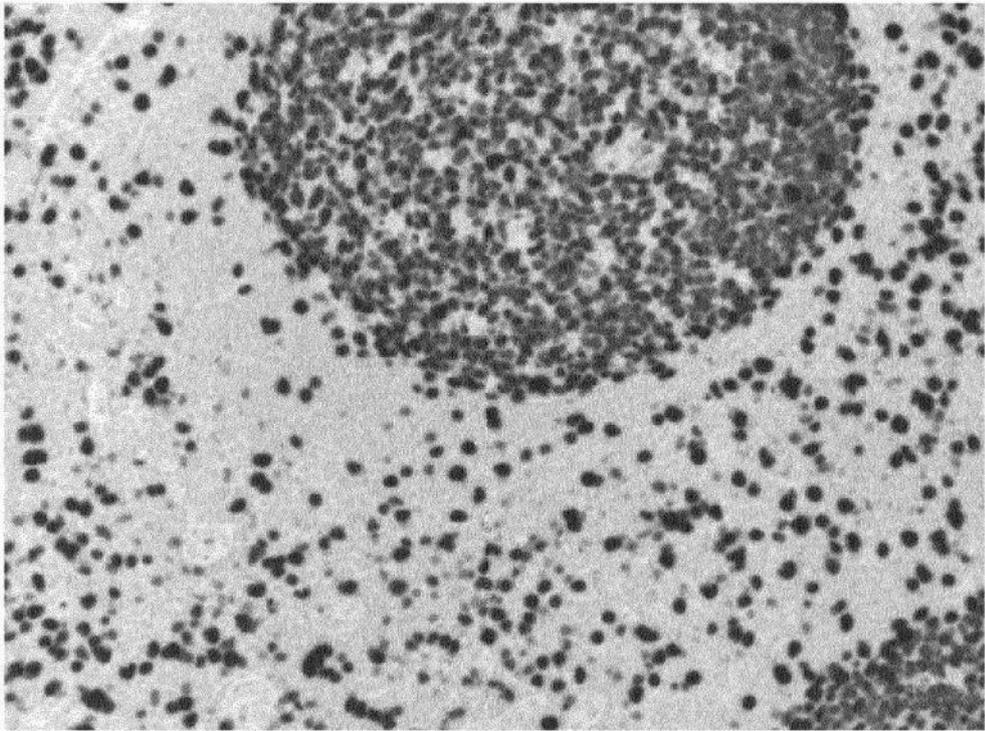


FIG. 22(B)

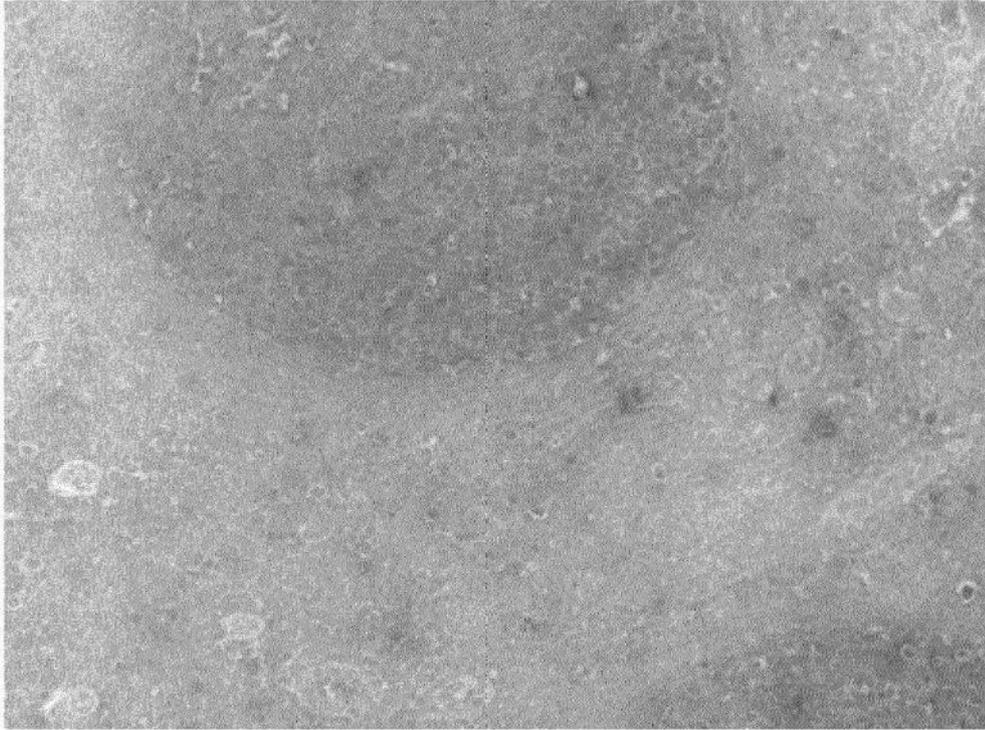


FIG. 22(C)

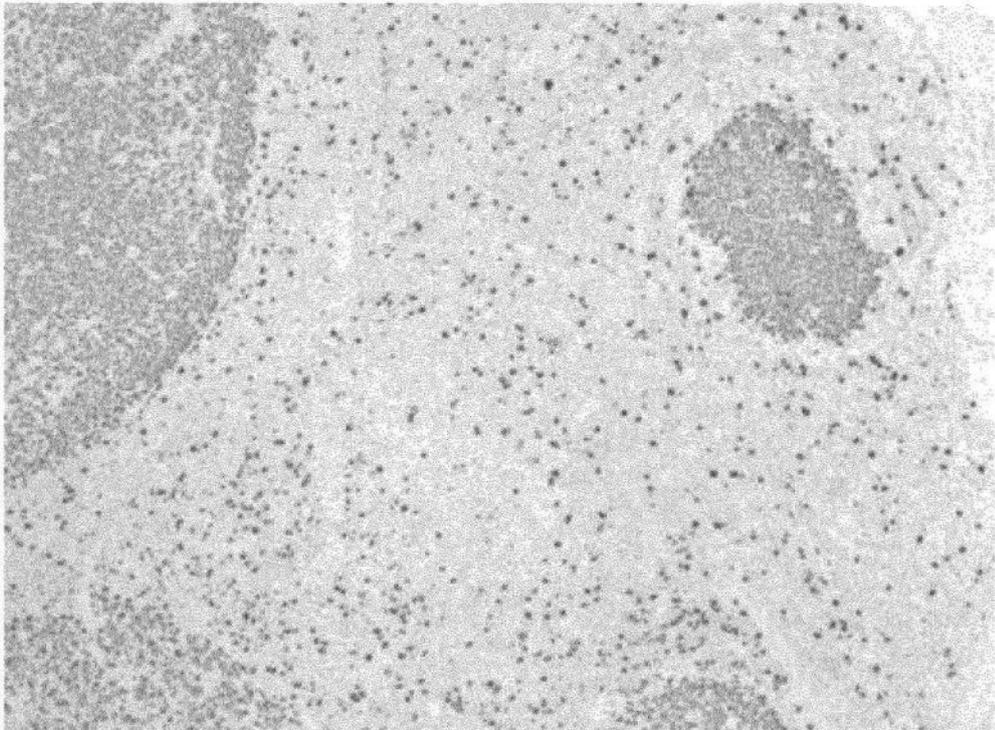


FIG. 22(D)

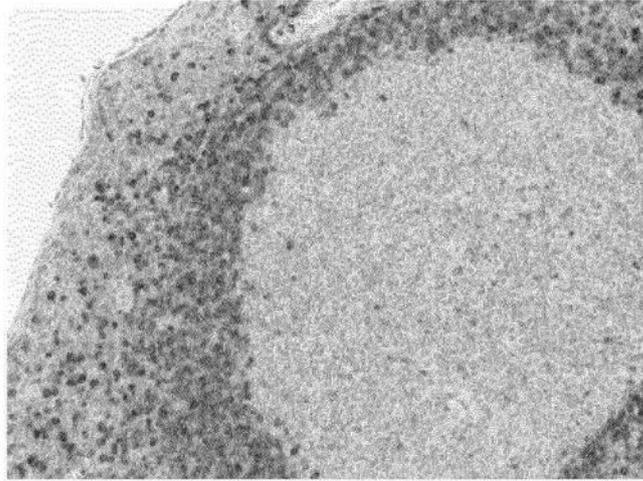


FIG. 23(A)

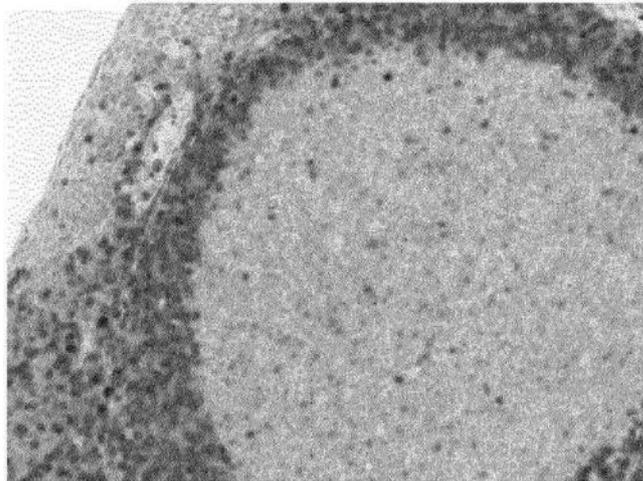


FIG. 23(B)

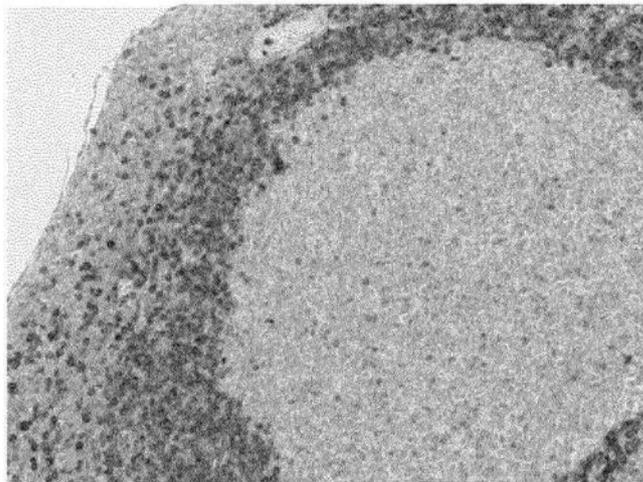


FIG. 23(C)

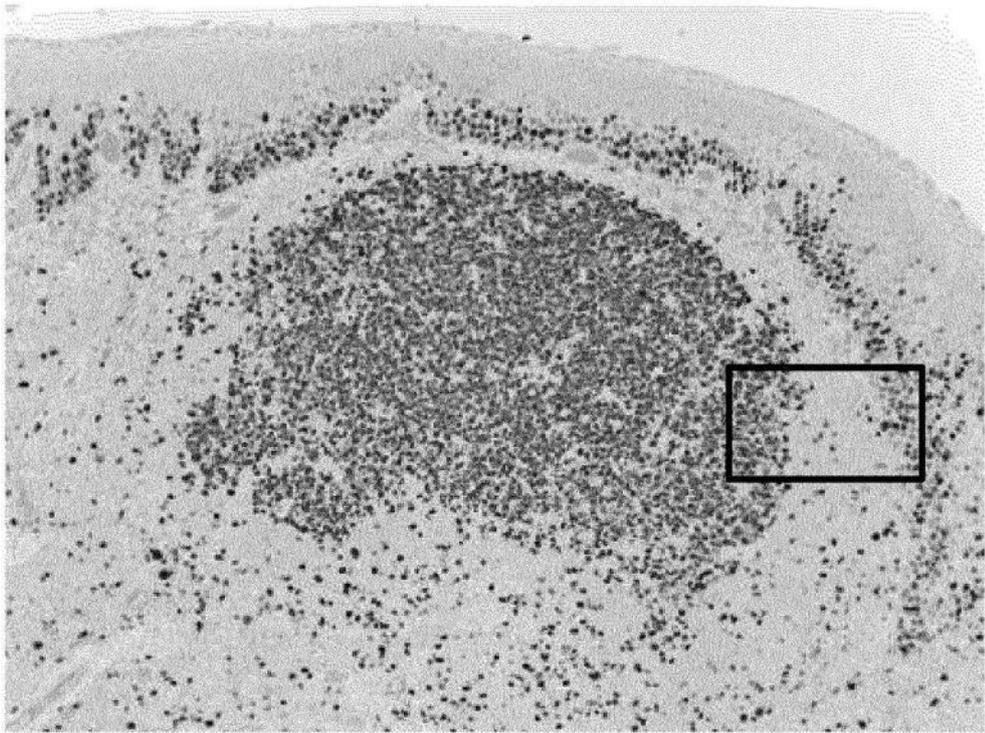


FIG. 24(A)

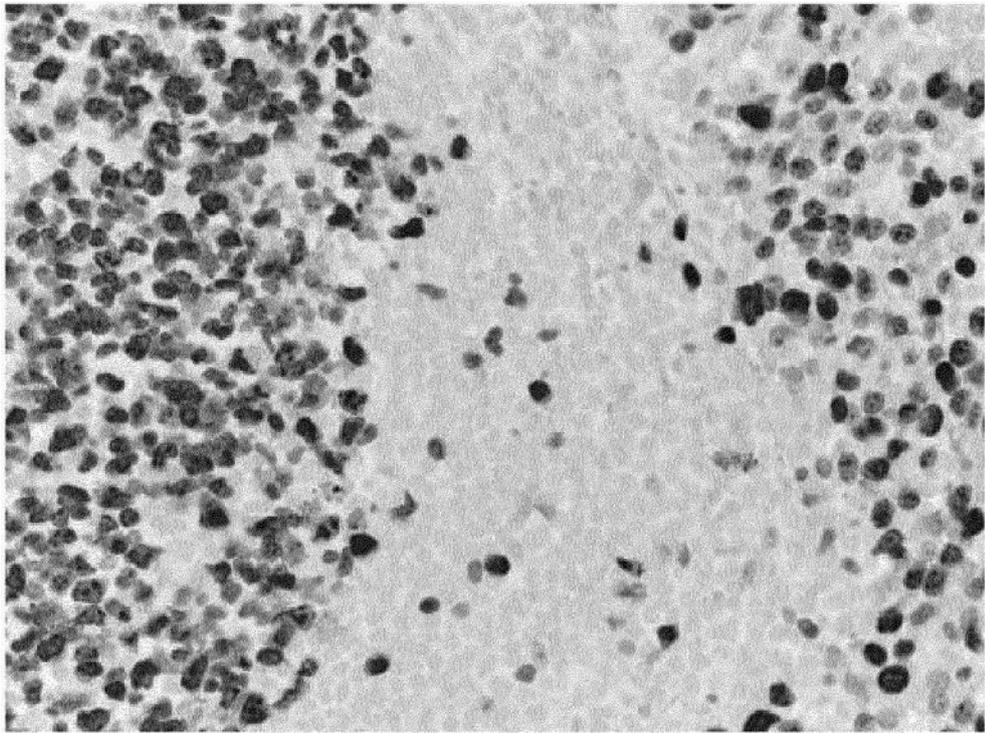


FIG. 24(B)

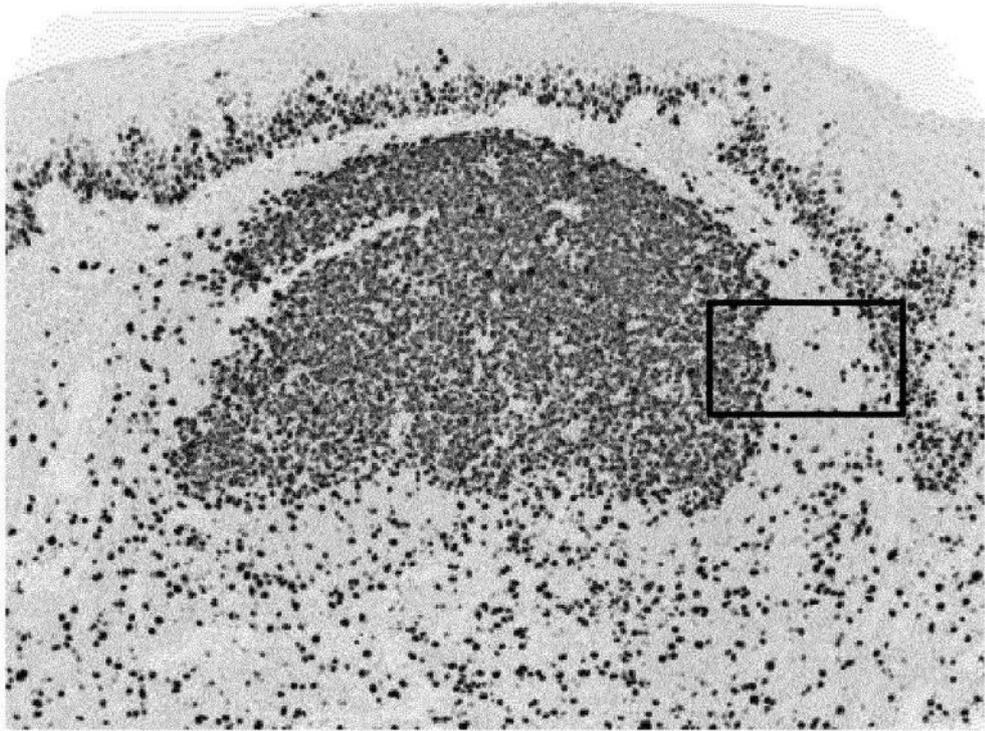


FIG. 25(A)

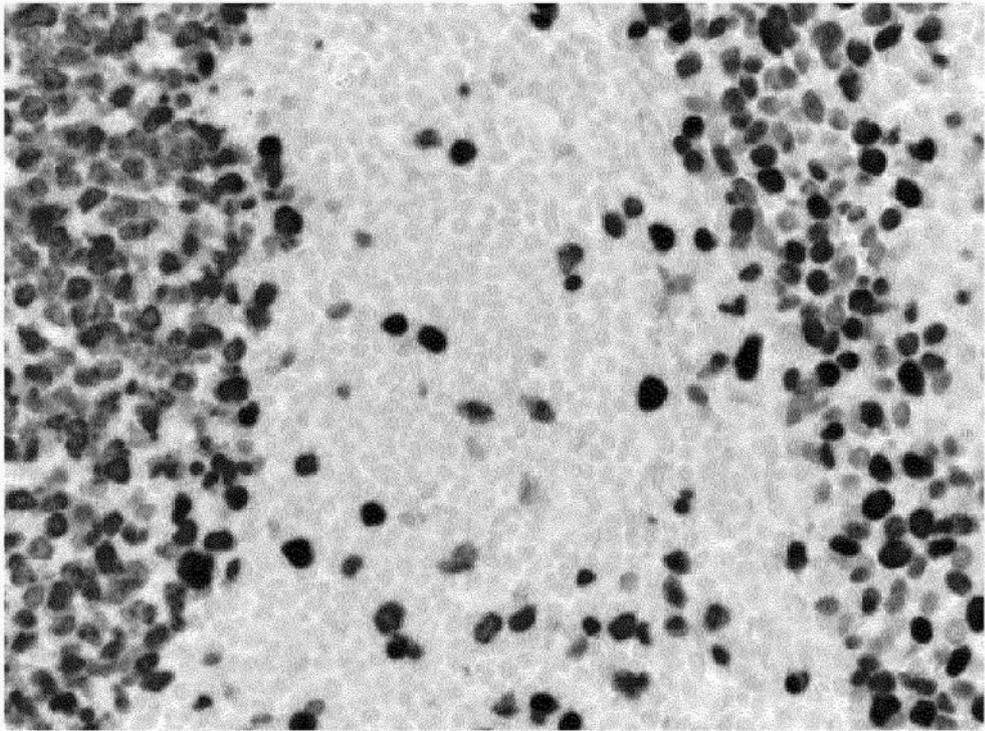


FIG. 25(B)

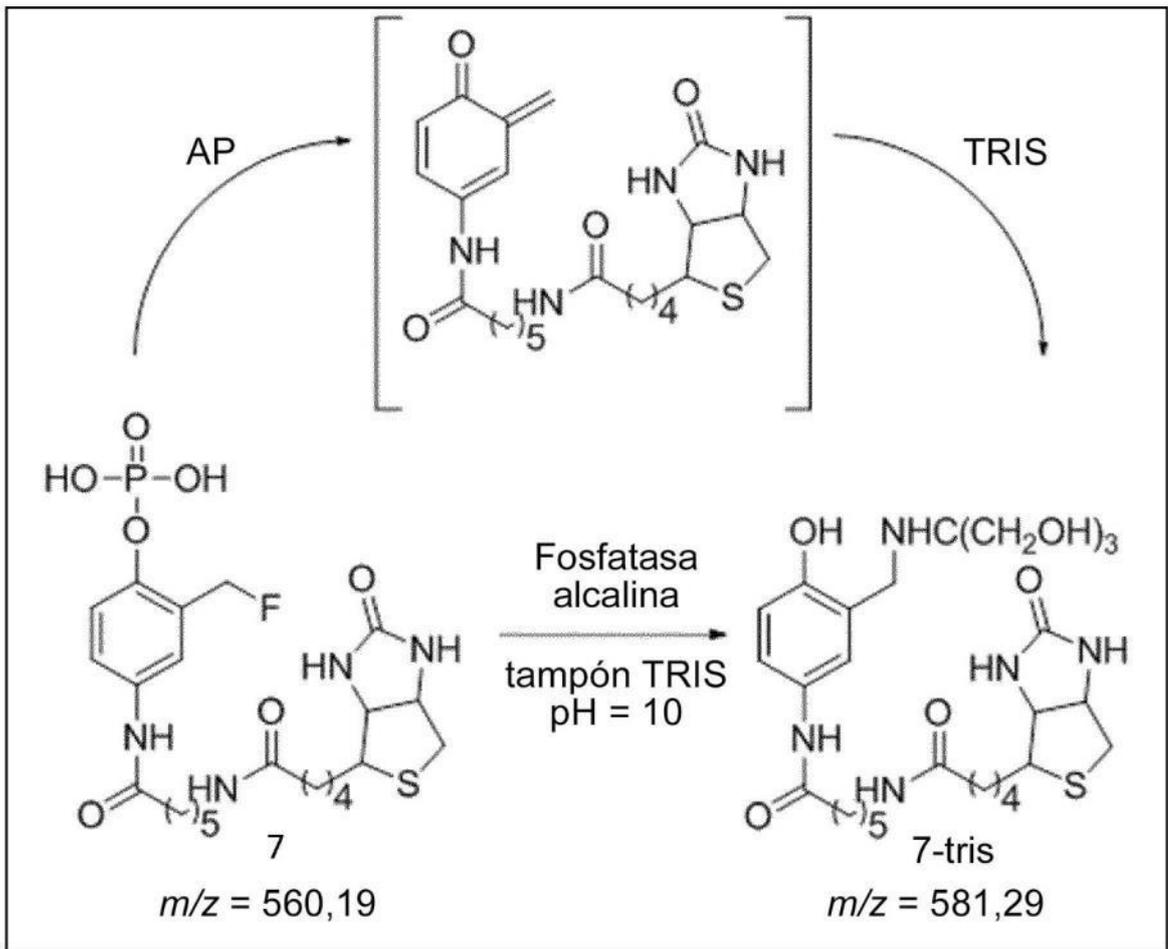


FIG. 26

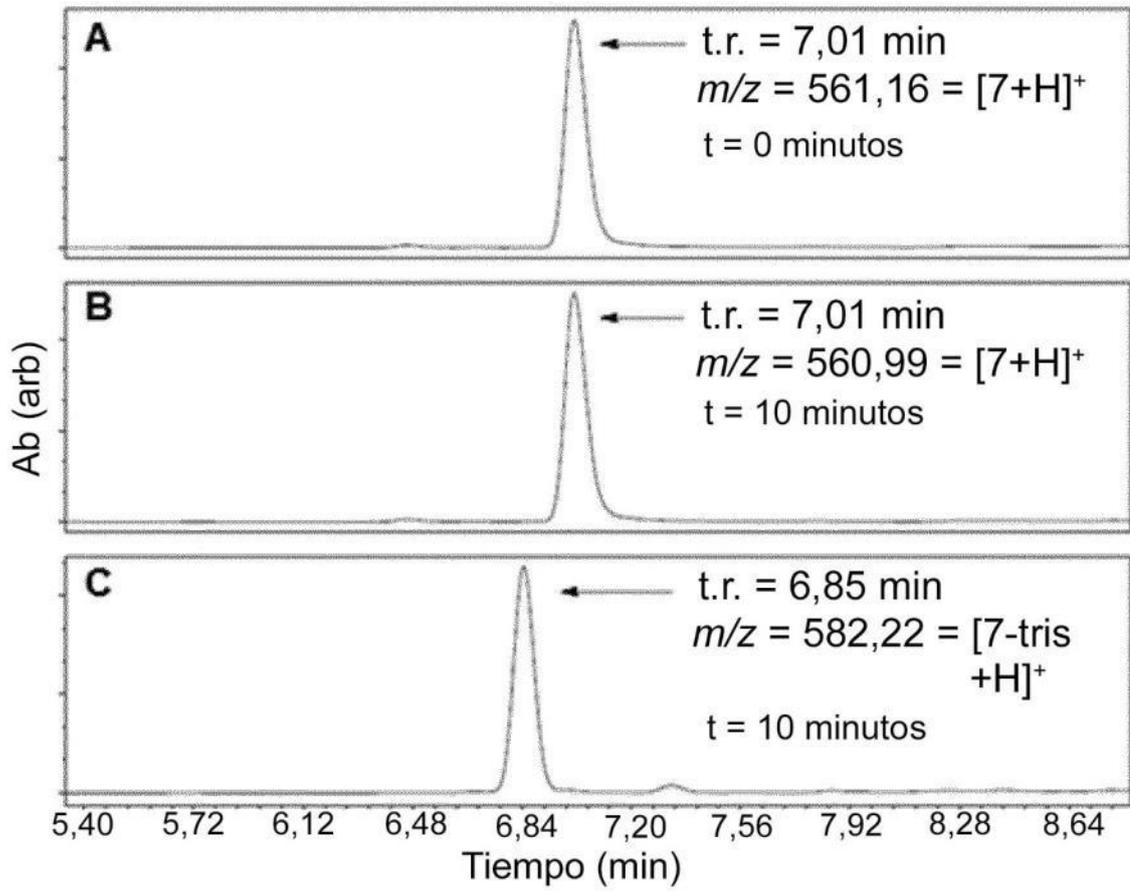


FIG. 27

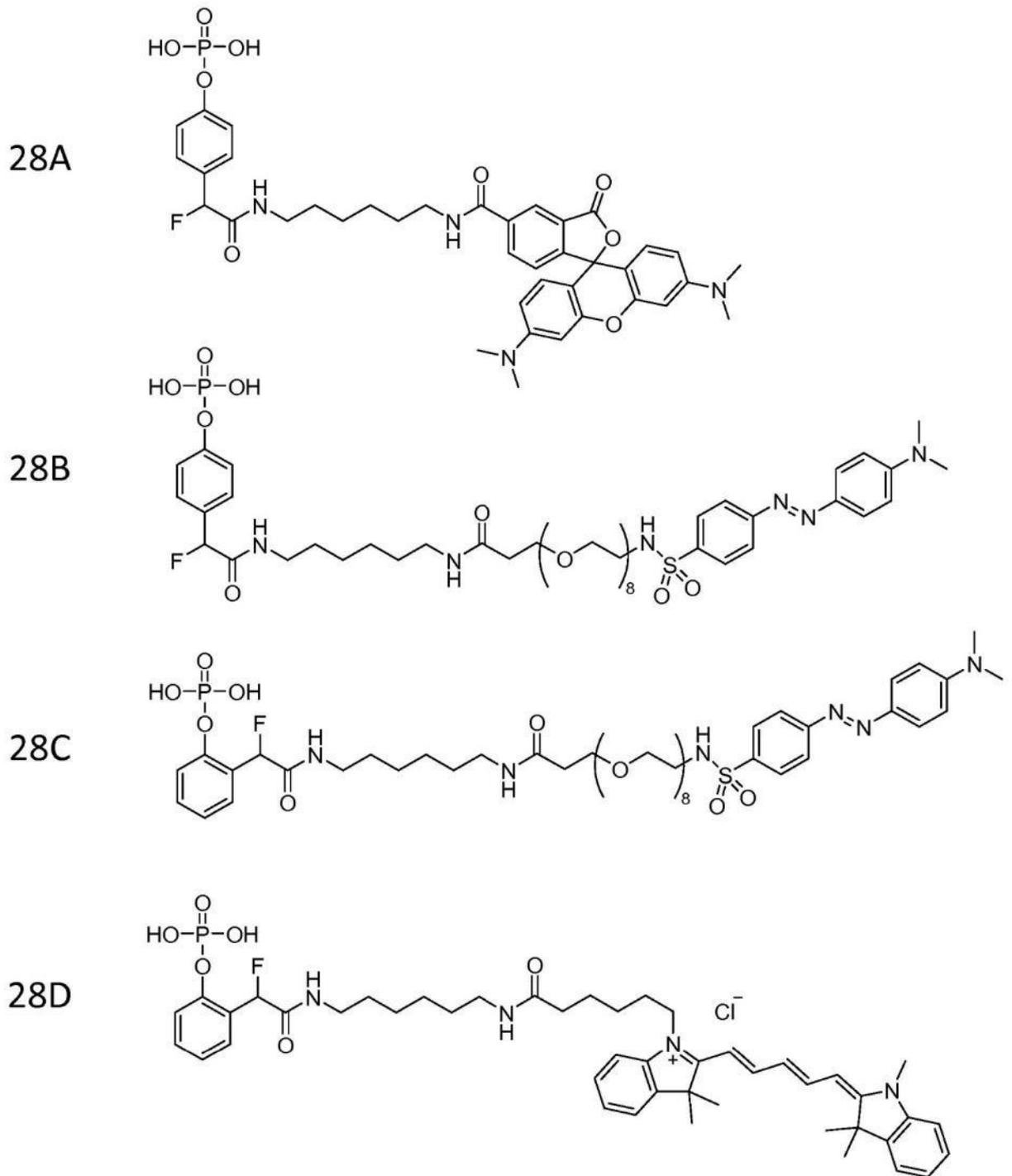
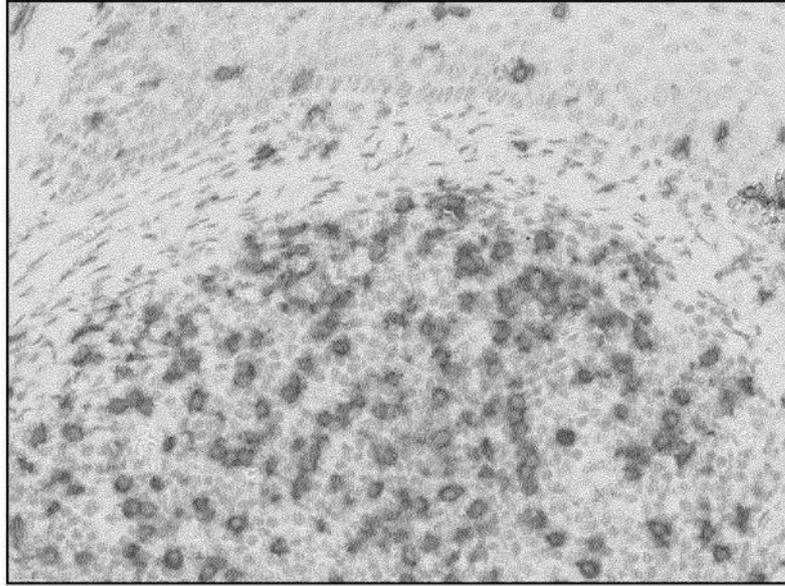
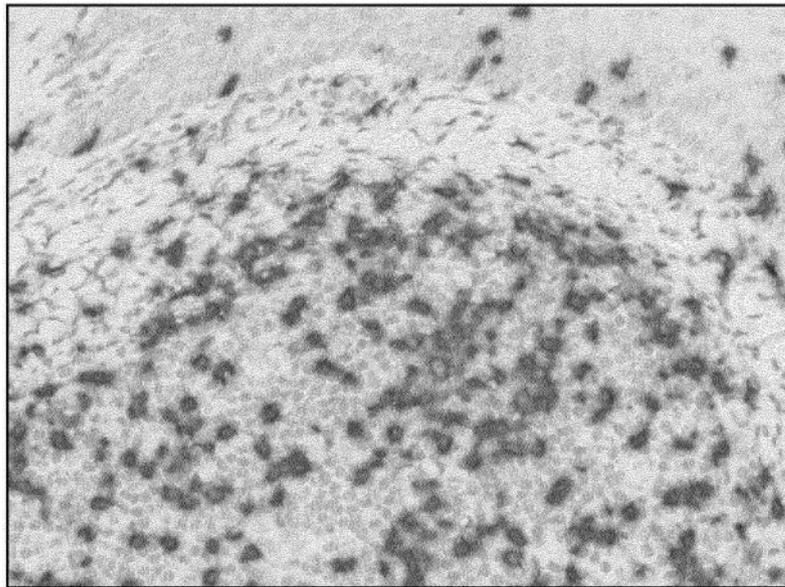


FIG. 28

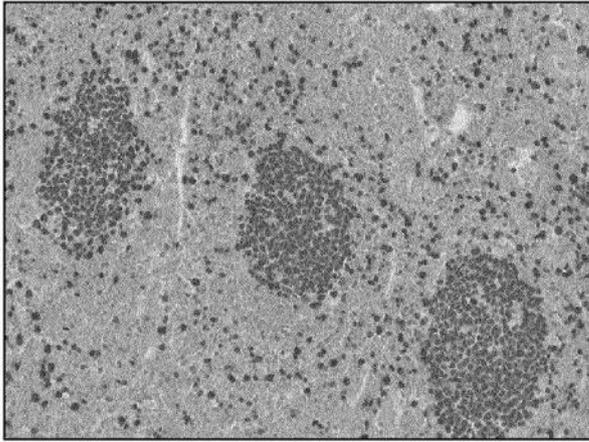


**29A**

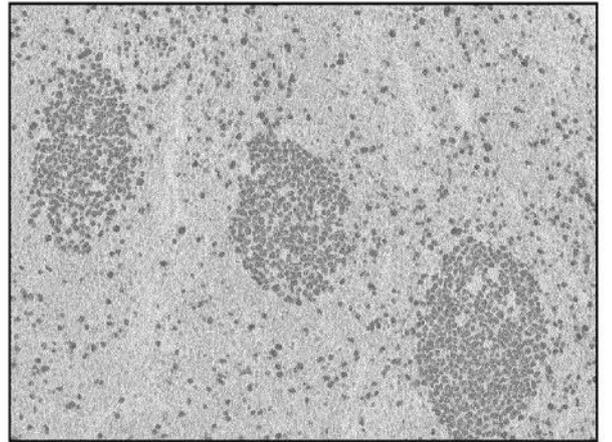


**29B**

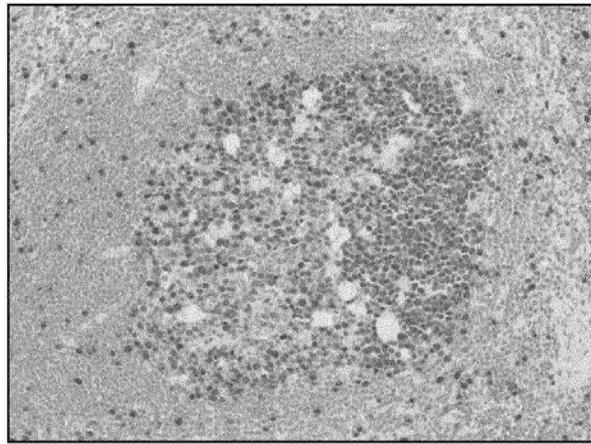
**FIG. 29**



**30A**



**30B**



**30C**

**FIG. 30**

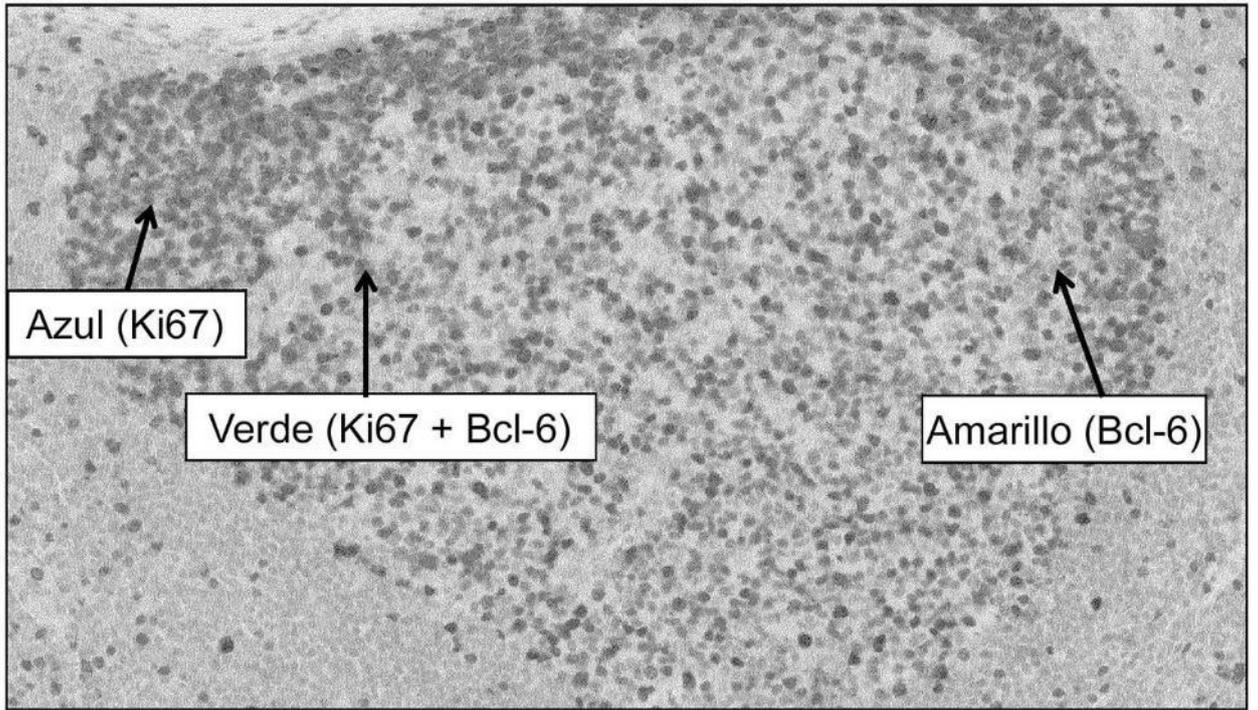
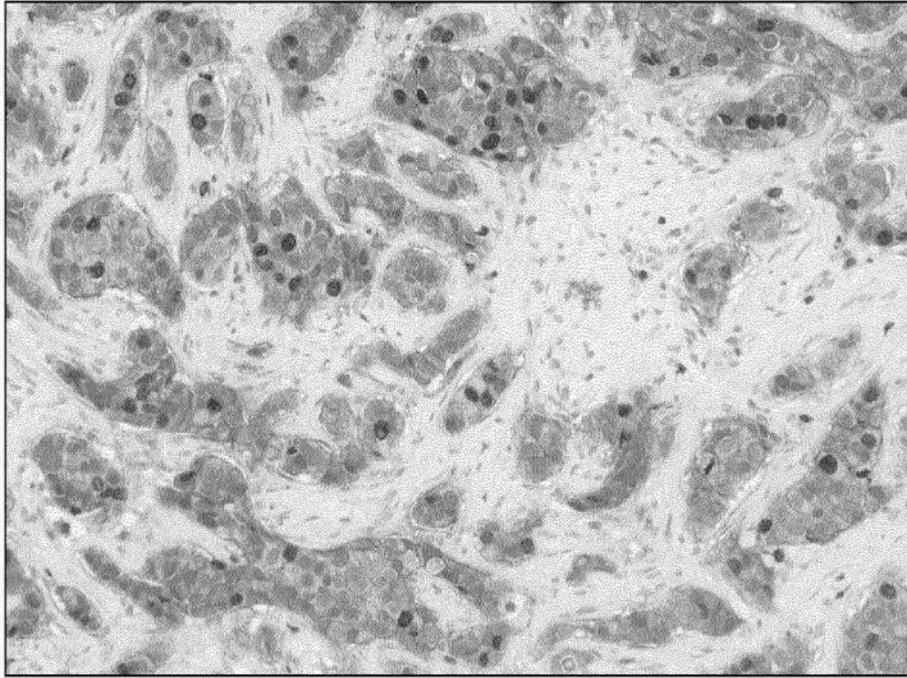
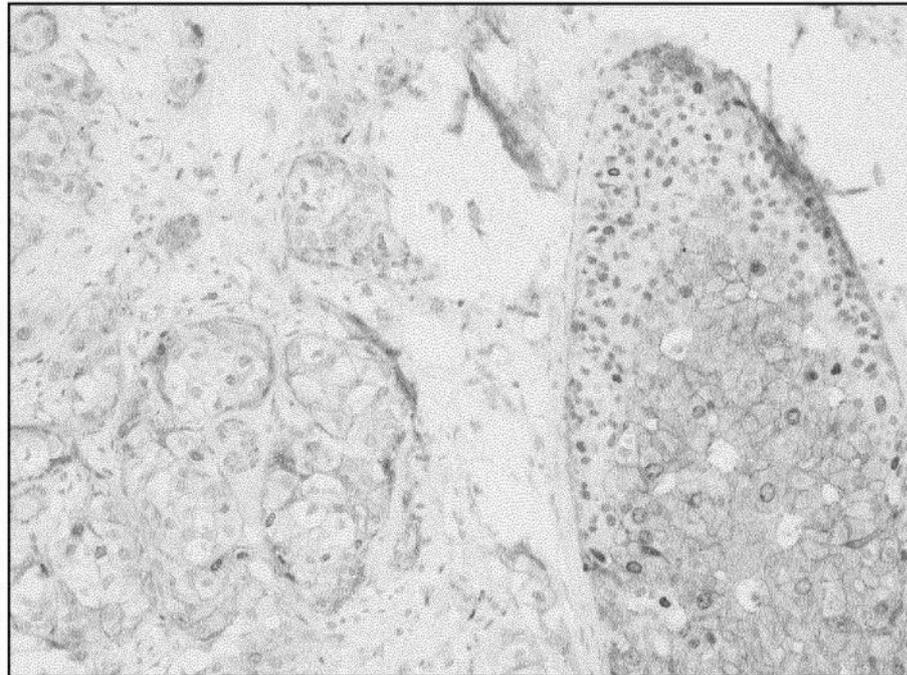


FIG. 31



**32A**



**32B**

**FIG. 32**

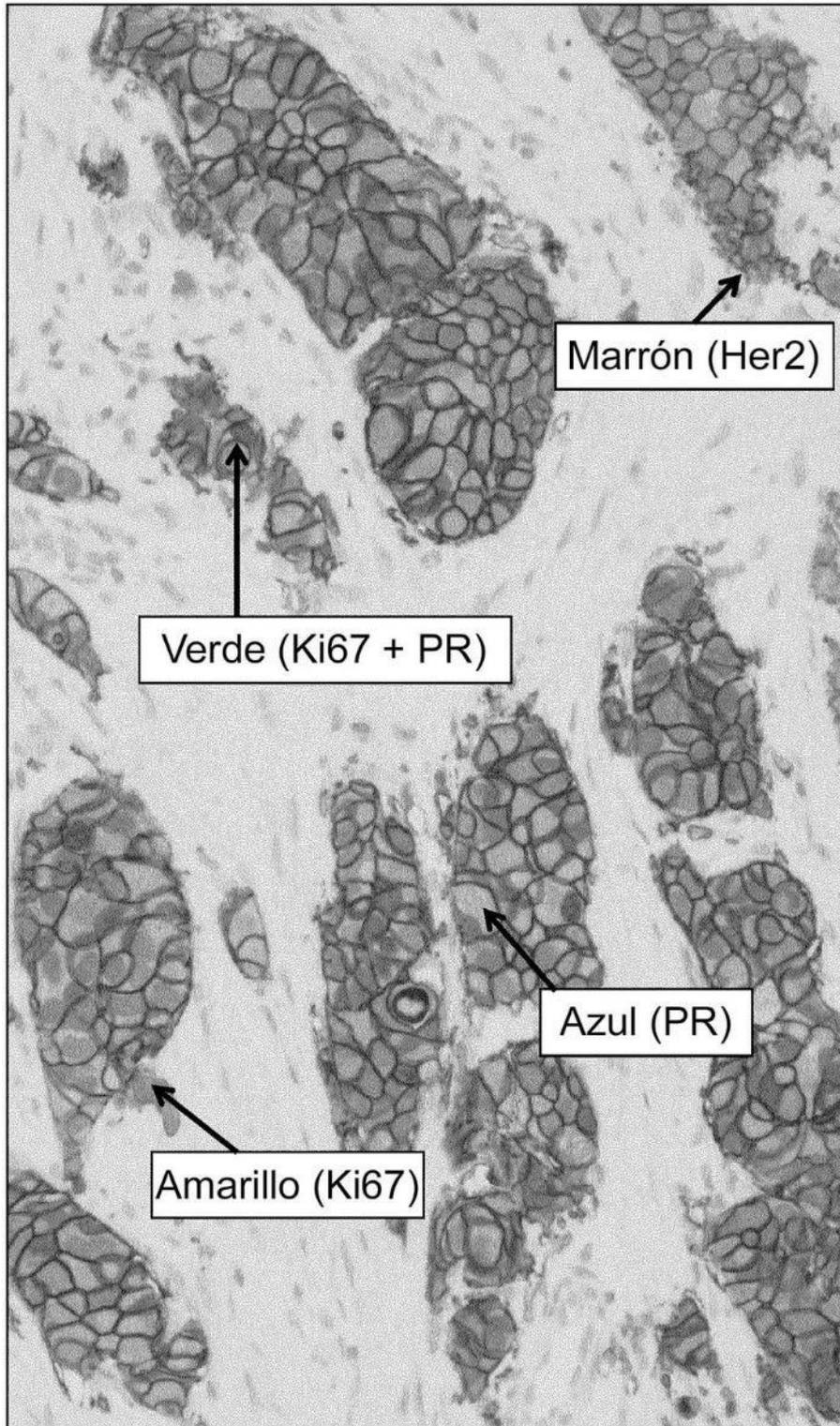


FIG. 33

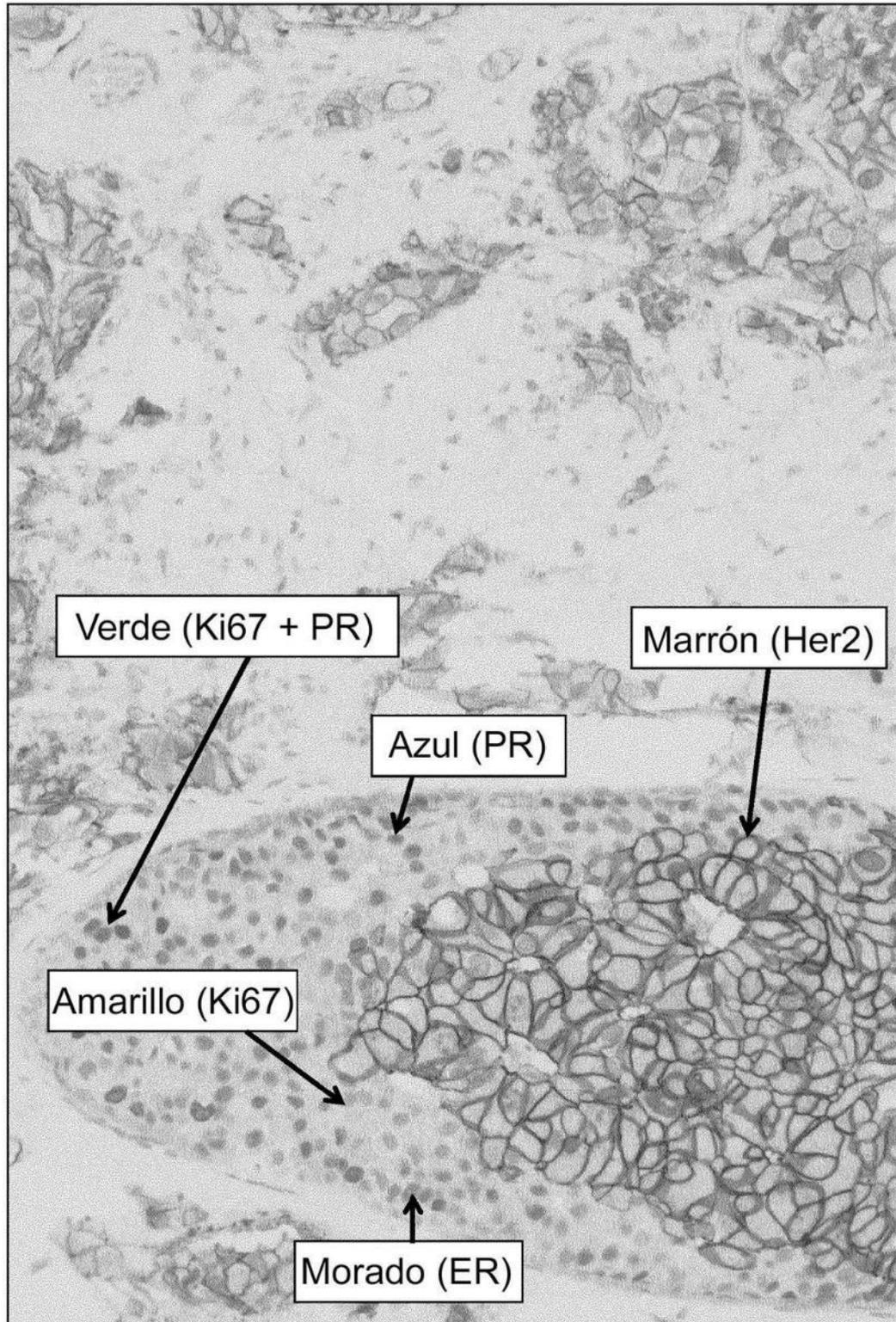
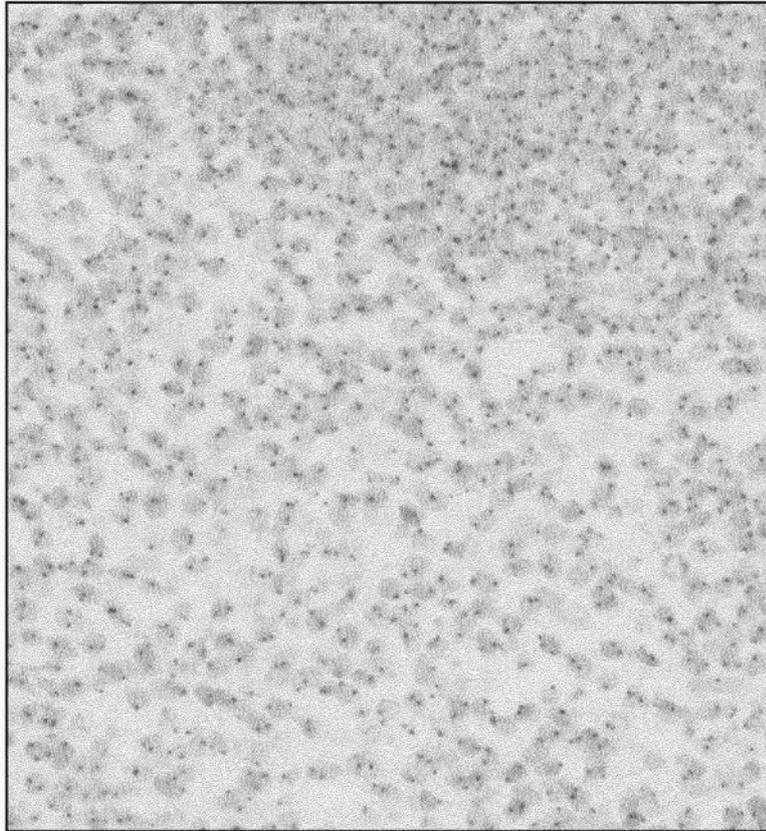
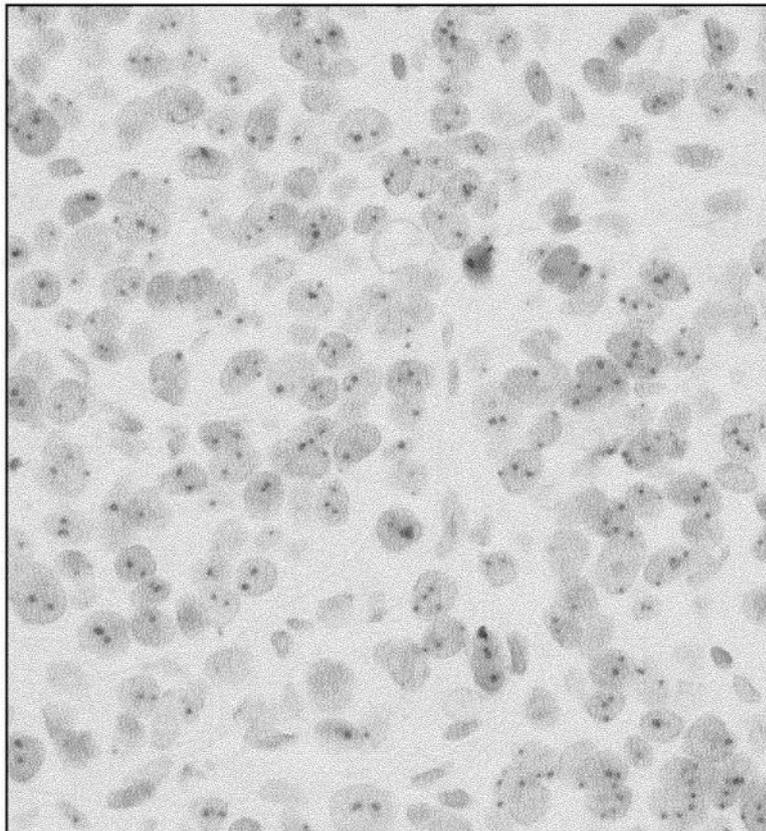


FIG. 34



**35A**



**35B**

**FIG. 35**

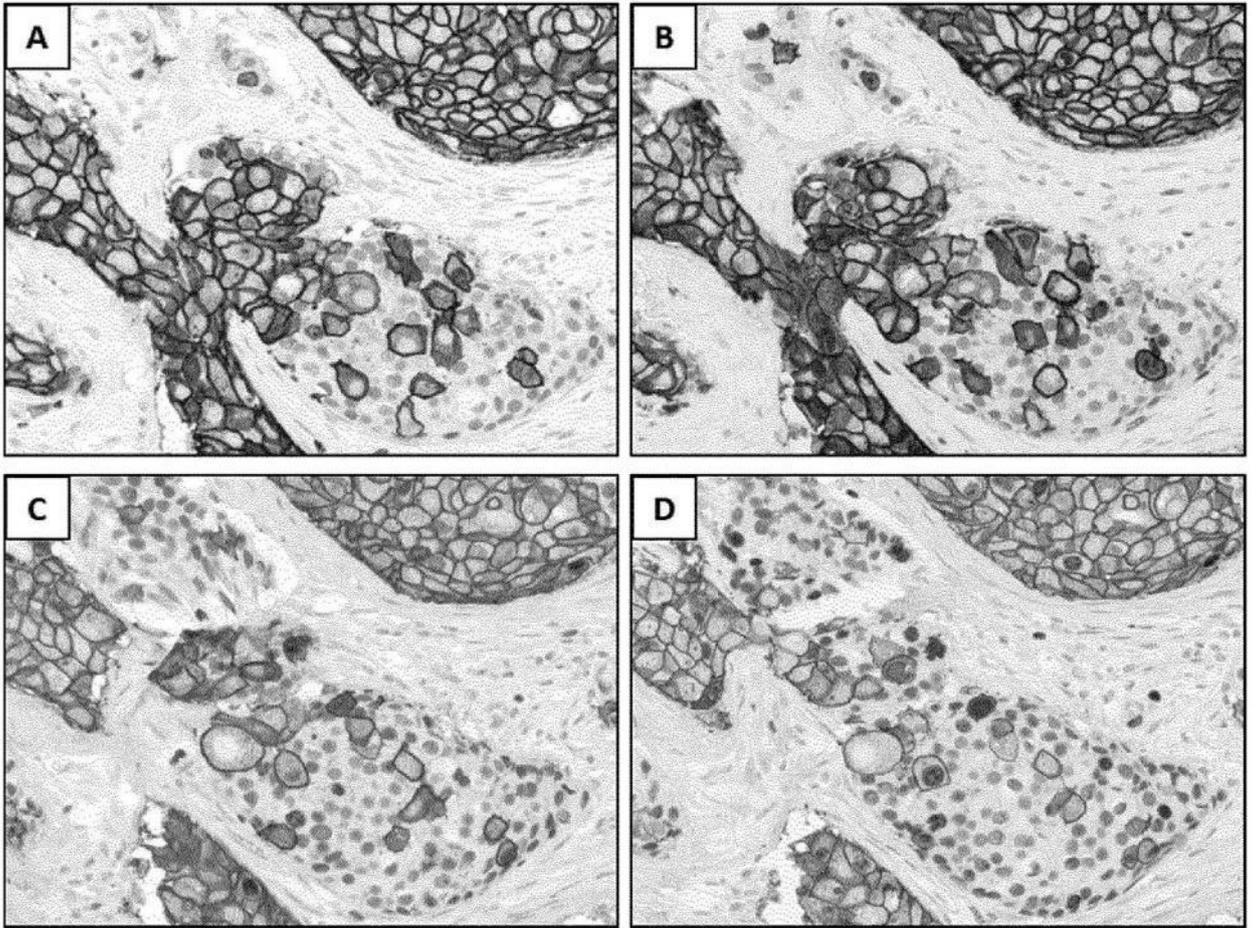


FIG. 36

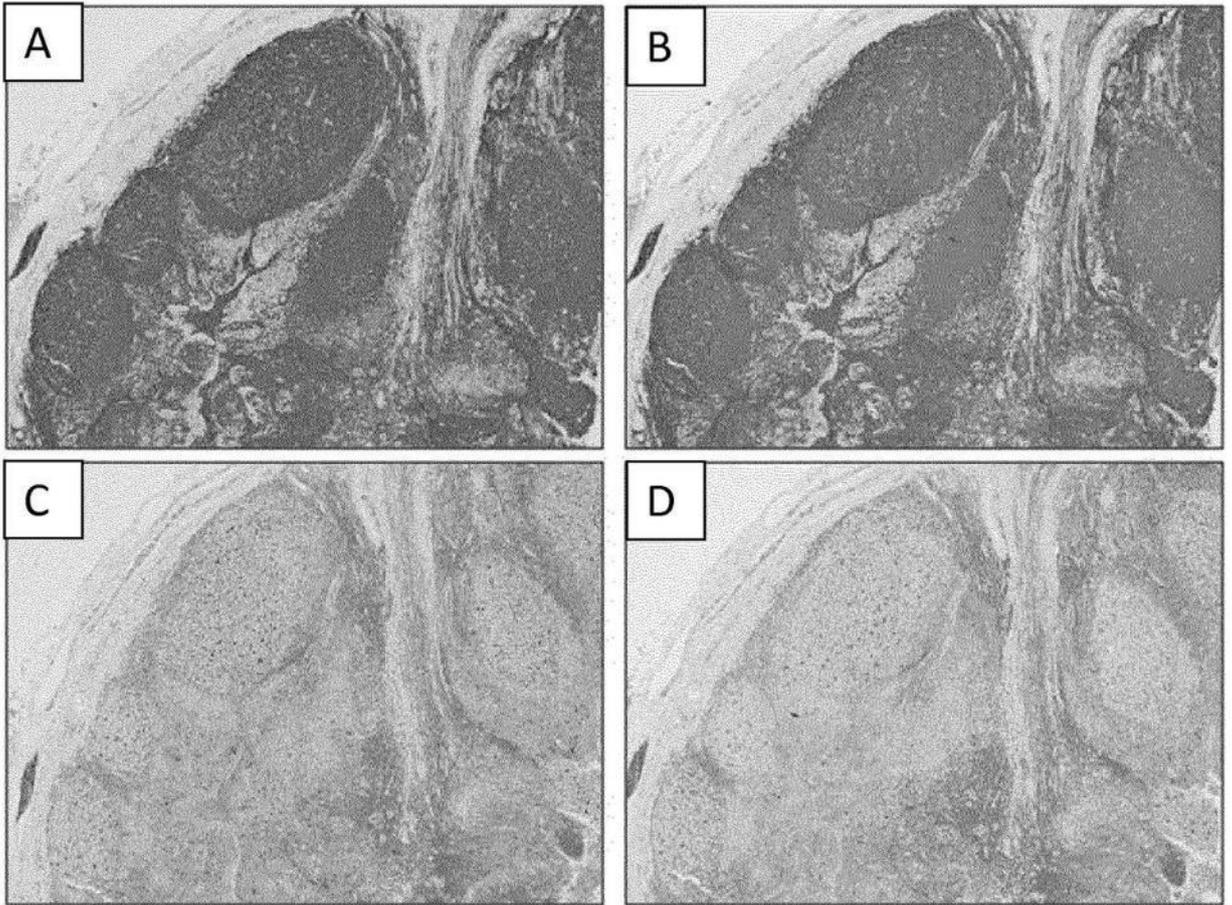


FIG. 37

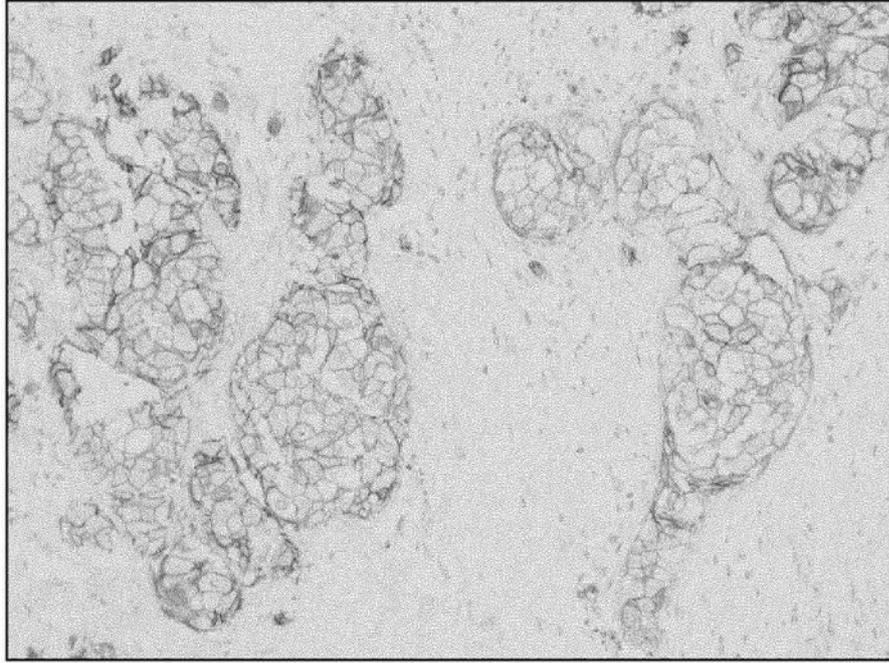


FIG. 38(A)

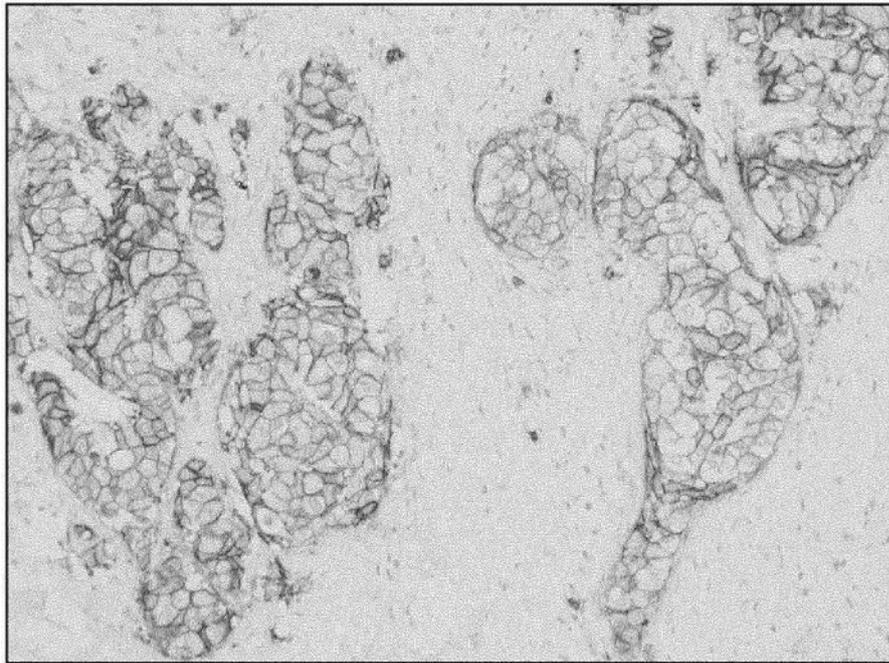


FIG. 38(B)