

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 858**

51 Int. Cl.:

C09B 11/24 (2006.01)

C09B 23/00 (2006.01)

C09B 49/06 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2011 PCT/US2011/044776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12012595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2011 E 11741365 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2596065**

54 Título: **Colorantes luminiscentes con un puente intramolecular soluble en agua y sus conjugados biológicos**

30 Prioridad:

12.07.2011 US 201113181107
21.07.2010 US 399995 P

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

14.05.2018

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (50.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US y
AAT BIOQUEST, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

DIWU, ZHENJUN;
MENG, QINGLIN;
LIAO, JINFANG;
GUO, HAITAO;
DUBROVSKY, TIMOTHY y
ABRAMS, BARNABY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 667 858 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

Colorantes luminiscentes con un puente intramolecular soluble en agua y sus conjugados biológicos.

Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/399.995 presentada el 21 de julio, 2010, y solicitud de Estados Unidos N° de serie 13/181.107, presentada el 12 de julio, 2011.

Campo de la invención

La invención se refiere a colorantes luminiscentes, que incluyen colorantes reactivos y conjugados de colorantes; y a sus usos biológicos.

10 Descripción de la técnica relacionada

Las sondas luminiscentes son reactivos valiosos para el análisis y separación de moléculas y células y para la detección y cuantificación de otros materiales. Se puede detectar un número muy pequeño de moléculas luminiscentes en circunstancias óptimas. Algunos ejemplos específicos de la aplicación de sondas fluorescentes son (1) la identificación y separación de subpoblaciones de células en una mezcla de células por la técnica de citometría de flujo de fluorescencia, separación de células activadas por fluorescencia y microscopía de fluorescencia; (2) determinación de la concentración de una sustancia que se une a una segunda especie (p. ej., reacciones de antígeno-anticuerpo) en la técnica del inmunoensayo de fluorescencia; (3) localización de sustancias en geles y otros soportes insolubles por las técnicas de tinción fluorescente. Estas técnicas se describen en Herzenberg, et al., "CELLULAR IMMUNOLOGY" 3ª ed., Capítulo 22; Blackwell Scientific Publications (1978); y Goldman, "FLUORESCENCE ANTIBODY METHODS", Academic Press, New York, (1968); y Taylor, et al., APPLICATIONS OF FLUORESCENCE IN THE BIOMEDICAL SCIENCES, Alan Liss Inc., (1986), y Shapiro, PRACTICAL FLOW CYTOMETRY, 4ª ed., Wiley-Liss (2003).

25 Cuando se usan colorantes luminiscentes para los fines anteriores, hay muchas restricciones en la elección del colorante fluorescente. Una restricción son las características de absorción y emisión del colorante fluorescente, puesto que muchos ligandos, receptores y materiales en la muestra que se está ensayando, p. ej., sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, tendrán fluorescencia e interferirán con una determinación precisa de la fluorescencia del marcador fluorescente. Este fenómeno se llama autofluorescencia o fluorescencia de fondo. Otra consideración es la capacidad para conjugar el colorante fluorescente con ligandos y receptores y otros materiales biológicos y no biológicos y el efecto de dicha conjugación en el colorante fluorescente. En muchas situaciones, la conjugación con otra molécula puede dar como resultado un cambio sustancial en las características fluorescentes del colorante fluorescente y, en algunos casos, destruir sustancialmente o reducir la eficacia cuántica del colorante fluorescente. También es posible que la conjugación con el colorante fluorescente inactive la función de la molécula que se marca. Una tercera consideración es la eficacia cuántica de los colorantes fluorescentes que debería ser alta para la detección sensible. Una cuarta consideración es la capacidad de absorción de luz, o el coeficiente de extinción, de los colorantes luminiscentes, que también deberían ser tan amplios como fuera posible. También es un problema si las moléculas fluorescentes interactuarán entre sí cuando estén cercanas, dando como resultado la autoamortiguación. Una preocupación adicional es si hay unión no específica de los colorantes luminiscentes con otros compuestos o las paredes del recipiente, por sí mismas o junto con el compuesto con el que se conjuga el colorante fluorescente.

40 La aplicabilidad y el valor de los métodos indicados antes están estrechamente unidos a la disponibilidad de compuestos fluorescentes adecuados. En particular, son necesarias sustancias fluorescentes que emitan en la región de longitudes de onda más largas (de amarillo al infrarrojo cercano), puesto que la excitación de estos cromóforos produce menos autofluorescencia y también múltiples cromóforos que tienen fluorescencia a diferentes longitudes de onda se pueden analizar simultáneamente si se pueden usar las regiones del visible e infrarrojo cercano completas del espectro. La fluoresceína, un compuesto fluorescente ampliamente usado, es un emisor útil en la región del verde, aunque en algunos inmunoensayos y sistemas de análisis de células la autofluorescencia de fondo generada por la excitación a las longitudes de onda de absorción de la fluoresceína, limitan la sensibilidad de la detección. Sin embargo, el marcador fluorescente rojo convencional rodamina ha demostrado ser menos eficaz que la fluoresceína.

50 Las ficobiliproteínas han hecho una contribución importante debido a su alto coeficiente de excitación y alto rendimiento cuántico. Estas proteínas que contienen cromóforo se pueden unir covalentemente a muchas proteínas y se usan en ensayos de anticuerpos de fluorescencia en microscopía y citometría de flujo. Las ficobiliproteínas tienen las desventajas de que (1) el procedimiento de marcaje de la proteína es relativamente complejo; (2) la eficacia del marcaje de la proteína normalmente no es alta (típicamente una media de 0,5 moléculas de ficobiliproteína por proteína); (3) las ficobiliproteínas son productos naturales y su preparación y purificación son complejas; (4) las ficobiliproteínas son caras; (5) actualmente no hay ficobiliproteínas disponibles como reactivos de marcaje que tengan fluorescencia más lejos de la región del rojo del espectro que la alofococianina, que tiene fluorescencia como máximo a 680 nm; (6) las ficobiliproteínas son proteínas grandes con pesos moleculares en el

intervalo de 33.000 a 240.000 y son más grandes que muchos materiales que se desean marcar, tales como metabolitos, fármacos, hormonas, nucleótidos derivatizados y muchas proteínas incluyendo anticuerpos. Esta última desventaja tiene importancia particular porque los anticuerpos, avidina, sondas de hibridación de ADN, hormonas y moléculas pequeñas marcadas con ficobiliproteínas grandes pueden no ser capaces de unirse a sus dianas debido a limitaciones estéricas impuestas por el tamaño del complejo conjugado.

Otras técnicas que implican histología, citología, inmunoensayos también se beneficiarían sustancialmente del uso de un colorante fluorescente con alta eficacia cuántica, características de absorción y emisión a longitudes de onda mayores, que tengan medios sencillos para la conjugación y que carezcan sustancialmente de interferencia no específica.

Los compuestos fluorescentes se unen de forma covalente o no covalente a otros materiales para impartir color y fluorescencia. Los colorantes luminiscentes brillantes permiten la detección o localización de los materiales unidos con gran sensibilidad. Algunos colorantes de carbocianina han demostrado utilidad como reactivos de marcaje para una variedad de aplicaciones biológicas, p. ej., patente de EE.UU. n° 4.981.977 de Southwick, et al. (1991); patente de EE.UU. n° 5.268.486 de Waggoner, et al. (1993); patente de EE.UU. n° 5.569.587 de Waggoner (1996); patente de EE.UU. n° 5.569.766 de Waggoner, et al. (1996); patente de EE.UU. n° 5.486.616 de Waggoner, et al. (1996); patente de EE.UU. n° 5.627.027 de Waggoner (1997); patente de EE.UU. n° 5.808.044 de Brush, et al. (1998); patente de EE.UU. n° 5.877.310 de Reddington, et al. (1999); patente de EE.UU. n° 6.002.003 de Shen, et al. (1999); patente de EE.UU. n° 6.004.536 de Leung, et al. (1999); patente de EE.UU. n° 6.008.373 de Waggoner, et al. (1999); patente de EE.UU. n° 6.043.025 de Minden, et al. (2000); patente de EE.UU. n° 6.127.134 de Minden, et al. (2000); patente de EE.UU. n° 6.130.094 de Waggoner, et al. (2000); patente de EE.UU. n° 6.133.445 de Waggoner, et al. (2000). No obstante, se sabe que muchos colorantes de carbocianina comparten algunas desventajas, p. ej., amortiguación importante de la fluorescencia de los colorantes de carbocianina en conjugados de biopolímeros, p. ej., amortiguación de variantes de colorantes Cy5 y Cy7 en conjugados, como describen Gruber, et al., BIOCONJUGATE CHEM., 11, 696 (2000). Además, algunos derivados de sulfoalquilo deseados de los colorantes de carbocianina reactivos son difíciles de preparar, como indican para las variantes de Cy3 y Cy5 Waggoner y colaboradores en BIOCONJUGATE CHEM., 4, 105, 109 (1993). Los colorantes de cianina también tienen una tendencia muy fuerte a autoagregarse (es decir, apilarse), lo cual puede reducir significativamente los rendimientos cuánticos de la fluorescencia, como se describe en la extensa revisión de Mishra, et al., CHEM. REV., 100, 1973 (2000).

Otro problema con los colorantes marcadores de carbocianina existentes es la rotación/vibración libre de dos cabezas de indolio (o benzotiazolio o benzoimidazolio) alrededor de los dobles enlaces conjugados del medio, que reduce significativamente sus intensidades de fluorescencia. Este fenómeno se llama "efecto de cinturón flojo" que se describe en "MODERN MOLECULAR PHOTOCHEMISTRY", Capítulos 5 y 6, University Science Books, Sausalito, CA, escrito por Nicholas J. Turro (1991).

Este llamado "efecto de cinturón flojo" se puede eliminar por la reticulación de las dos cabezas. Describe la reticulación 1,1' de cianinas R. Singh, et al. documento WO 01/02374 (2001), que se supone que elimina el "efecto de cinturón flojo" descrito antes. Sin embargo, Diwu et al., patente de EE.UU. n° 7.465.810, observó que la reticulación 1,1' realmente causaba menos rendimiento cuántico de la fluorescencia de los conjugados de colorante-proteína comparado con el de los conjugados de carbocianina-proteína no reticulados en relaciones similares de colorante/proteína. Esta disminución de la fluorescencia desfavorable puede ser causada por la estereoquímica inadecuada de la reticulación 1,1' o por la mayor hidrofobicidad, que resulta de la adición del puente altamente hidrófobo.

Diwu et al., patente de EE.UU. n° 7.465.810, observaron que las propiedades de fluorescencia de los colorantes marcadores de cianina mejoraban por la reticulación intramolecular de los dos restos de indolina entre la posición 1 y la posición 3'. Las carbocianinas 1,3'-reticuladas son superiores a los conjugados de colorantes 1,1'-reticulados o no reticulados espectralmente similares. Esta mejora con la cianina 1,3'-reticulada puede ser resultado de la configuración favorable. Sin embargo, el puente hidrófobo aumenta significativamente la hidrofobicidad del colorante. Comparado con colorantes de carbocianina no reticulados, la conjugación de las carbocianinas 1,3'-reticuladas o 1,1'-reticuladas con proteínas y otras moléculas biológicas a menudo produce la precipitación de las moléculas diana de marcaje debido a la solubilidad en agua significativamente reducida de los colorantes marcadores causado por la reticulación altamente hidrófoba. En algunos casos, la reticulación de las carbocianinas por un puente altamente hidrófobo da como resultado una pérdida de actividad completa de las moléculas diana que se van a marcar.

Los autores de la invención descubrieron nuevos reticuladores solubles en agua que no solo eliminan el "efecto de cinturón flojo" para aumentar los rendimientos cuánticos de fluorescencia de colorantes marcadores, sino que también aumentan su solubilidad en agua, eliminando de esta forma el inconveniente de precipitación de proteínas con los colorantes luminiscentes existentes que contienen un puente de reticulación hidrófobo. Encontraron que esta estrategia de puente soluble en agua también se puede usar para mejorar las propiedades de marcaje y espectrales de colorantes luminiscentes de otros tipos.

Los colorantes de xanteno son otra clase de sondas fluorescentes que se usan predominantemente para marcar proteínas y otras moléculas biológicas, p. ej., patente de EE.UU. n° 7.704.284 de Eliu, et al. (2010); patente de

EE.UU. nº 7.491.830 de Lam, et al. (2009); patente de EE.UU. nº 7.344.701 de Reddington, et al. (2008); patente de EE.UU. nº 6.229.055 de Klaubert, et al. (2001); patente de EE.UU. nº 6.130.101 de Mao et al. (2000). Los autores de la invención descubrieron que el “efecto de cinturón flojo” de los colorantes de xanteno se puede eliminar por reticulación de los dos cabezas sustituyentes con los nuevos reticuladores solubles en agua, mientras que sus solubilidades en agua también aumentan significativamente. Se puede usar el mismo principio para aumentar simultáneamente los rendimientos cuánticos de fluorescencia y solubilidad en agua de conjugados de colorante de oxazol-proteína y conjugados de complejo metálico luminiscente-proteína.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Comparación de rendimientos cuánticos de fluorescencia de conjugados de colorante-anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (GAR) que se preparan respectivamente a partir de las cianinas 133, 134 y 135 (éster de NHS de Cy5) y se caracterizan como se describe en los ejemplos 56. Sus soluciones en PBS se ajustan para tener la misma absorción de $DO = 0,05$ a 600 nm. Las soluciones de PBS son excitadas a 600 nm y las emisiones se barren de 620 a 800 nm. El conjugado de proteína preparado a partir del compuesto 134 (curva A, colorante/proteína = 4,8) es mucho más brillante que los conjugados preparados a partir del compuesto 133 (curva B, colorante/proteína = 4,6) o 135 (curva C, colorante/proteína = 4,5). El compuesto 133 hace que la proteína precipite cuando la relación de colorante/proteína es mayor que 10, mientras que el conjugado de colorante-proteína del compuesto 134 es todavía soluble en agua cuando la relación de colorante/proteína es mayor que 10.

Figura 2. Comparación de rendimientos cuánticos de fluorescencia de conjugados de colorante-anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (GAR) que se preparan respectivamente a partir de las cianinas 39, 136 y 137 (éster de Bis-NHS de Cy5) y se caracterizan como se describe en los ejemplos 56. Sus soluciones en PBS se ajustan para tener la misma absorción de $DO = 0,05$ a 600 nm. Las soluciones de PBS son excitadas a 600 nm y las emisiones se barren de 620 a 800 nm. El conjugado de proteína preparado a partir del compuesto 39 (curva A, colorante/proteína = 5,1) es mucho más brillante que los conjugados preparados a partir del compuesto 136 (curva C, colorante/proteína = 5,0) o 137 (curva B, colorante/proteína = 5,3). El compuesto 136 hace que la proteína precipite cuando la relación de colorante/proteína es mayor que 8, mientras que el conjugado de colorante-proteína del compuesto 39 es todavía soluble en agua cuando la relación de colorante/proteína es mayor que 8.

Figura 3. Comparación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de conjugados de colorante-anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (GAR) que se preparan respectivamente a partir de la rodamina 43 y 132 y se caracterizan como se describe en los ejemplos 56. Sus soluciones en PBS se ajustan para tener la misma absorción de $DO = 0,1$ a 450 nm. Las soluciones de PBS son excitadas a 460 nm y las emisiones se barren de 470 a 650 nm. El conjugado de proteína preparado a partir del compuesto 43 (curva A, colorante/proteína = 4,5) es mucho más brillante que el conjugado preparado a partir del compuesto 132 (curva B, colorante/proteína = 4,7). El compuesto 132 hace que la proteína precipite cuando la relación de colorante/proteína es mayor que 12, mientras que el conjugado de colorante-proteína del compuesto 43 es todavía soluble en agua cuando la relación de colorante/proteína es mayor que 12.

Figura 4. Síntesis de una cianina que tiene un puente intramolecular 1,1'-reticulado soluble en agua.

Figura 5. Síntesis de una cianina que tiene un puente intramolecular 1,3'-reticulado soluble en agua.

Figura 6. Síntesis de una cianina que tiene un puente intramolecular 3,3'-reticulado soluble en agua.

Figura 7. Síntesis de un oxazol que tiene un puente intramolecular soluble en agua.

Figura 8. Síntesis de una rodamina que tiene un puente intramolecular soluble en agua.

Figura 9. Síntesis de un complejo de europio que tiene un puente intramolecular soluble en agua.

Figura 10. Comparación de citometrías de flujo de conjugados de anticuerpo de ratón anti-CD4 humano del compuesto 49 y Pacific Orange (Invitrogen). Se incubó sangre normal con conjugados de anticuerpo de ratón anti-CD4 humano del compuesto 108 y Pacific Orange. Después de incubación con los conjugados de anticuerpo, la sangre tratada se decanta y el sedimento se suspende en 0,5 ml de BSA/PBS al 0,5% para el análisis en un citómetro de flujo BD™ LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA). El análisis se lleva a cabo con la excitación a 405 nm de un láser violeta, recogiendo la emisión por un filtro de paso de banda de 550/40 nm. Usando una gráfica de PUNTOS DE FSC FRENTE A SSC LOS LINFOCITOS SON REGULADOS Y SE MIDE LA FLUORESCENCIA MEDIANA.

RESUMEN DE LA INVENCION Y DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES PREFERIDAS

Los autores de la invención han descubierto que una nueva clase de puente de reticulación soluble en agua mitiga inesperadamente problemas descritos en la sección de antecedentes y produce conjugados de colorante-polímero que son sustancialmente más luminiscentes en proteínas, ácidos nucleicos y otros biopolímeros, que los conjugados marcados con colorantes no reticulados estructuralmente similares o los colorantes que se reticulan con un puente

hidrófobo (véase las figuras 1, 2 y 3). La intensidad de la luminiscencia potenciada y la afinidad de unión retenida de los conjugados de colorante-biomolécula de la invención producen mayor sensibilidad del ensayo.

Además, los colorantes de la invención típicamente presentan máximos de absorbancia entre aproximadamente 400 nm y 1000 nm, por lo que estos colorantes se pueden seleccionar para que se correspondan con las líneas de emisión principales del láser violeta (405 nm), láser de argón (488 nm), lámpara de arco de mercurio (546 nm), láser de Nd-Yag de doble frecuencia (532 nm), láser de Kr-hierro (568 nm y 647 nm), láser de He-Ne (543 nm, 594 nm, y 633 nm) o diodos de láser de longitud de onda larga (en especial 635 nm y más larga). Algunos colorantes de la invención presentan excitación a longitud de onda muy larga (al menos 640 nm, pero algunos mayor de aproximadamente 730 nm) y bandas de emisión (al menos 665 nm, y algunos mayores de 750 nm), por lo que son particularmente útiles para muestras que son transparentes a longitudes de onda del infrarrojo.

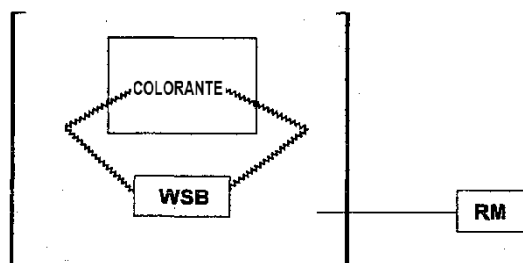
La presente invención comprende colorantes luminiscentes químicamente reactivos como se define en las reivindicaciones, que están reticulados con un puente soluble en agua (WSB, por sus siglas en inglés *water soluble bridge*) y sus conjugados. Los colorantes y conjugados de colorantes se usan para localizar y detectar la interacción o presencia de analitos o ligandos en una muestra. Los kits que incorporan dichos colorantes o conjugados de colorantes facilitan su uso en dichos métodos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona conjugados de colorantes que comprenden uno o más colorantes luminiscentes que están reticulados con un puente soluble en agua (WSB) conjugados con un biopolímero como se define en las reivindicaciones. En realizaciones preferidas, los conjugados de colorantes se usan como reactivos de detección fluorescentes para detectar, identificar, localizar o cuantificar analitos en una muestra.

Los conjugados de biopolímero-colorante fluorescentes de la invención tienen utilidad como, o como parte de reactivos de detección, incluyendo reactivos de detección específicos de analito. Los biopolímeros útiles incluyen, por ejemplo, polímeros aminoácidos, polímeros de ácido nucleico, polisacáridos, hidratos de carbono y lípidos. En una realización preferida, el componente de biopolímero del conjugado de colorante-biopolímero es un polímero de aminoácido, como se define ampliamente en la presente memoria. En una realización preferida, el biopolímero es un anticuerpo monoclonal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que contienen los conjugados de colorante de la presente invención y un segundo componente de ensayo. Los kits de la presente invención pueden contener componentes adicionales útiles para llevar a cabo la aplicación pretendida, tal como otros reactivos o tampones.

Los colorantes de la invención típicamente tienen la fórmula 1:



Fórmula 1

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente definido en las reivindicaciones; RM (por sus siglas en inglés *reactive moieties*) es un resto químicamente reactivo descrito más adelante; WSB es un puente soluble en agua que se usa para la reticulación de dos anillos diferentes del colorante luminiscente y contiene al menos un grupo sulfonato o fosfonato.

Los colorantes de la invención comprenden un colorante luminiscente que contiene: 1) un grupo RM; 2) un puente no conjugado y soluble en agua que reticula intramolecularmente dos anillos diferentes del colorante luminiscente. En una realización de la invención, el primer o segundo sistema de anillo está sustituido por una cadena lateral que contiene un grupo RM. En otra realización, el WSB contiene un grupo RM.

En un aspecto de la invención, los colorantes luminiscentes de la invención están sulfonados una o más veces. Además, los colorantes de la invención están sustituidos con uno o más restos químicamente reactivos (RM) o sustancias conjugadas como se describe más adelante. En una realización preferida, el colorante de la invención está sustituido con solo un RM.

El WSB preferido incorpora al menos un grupo cargado negativo (p. ej., carboxi, sulfonato, fosfato y fosfonato) para aumentar la solubilidad en agua. Por "sulfonato" se entiende ácido sulfónico o sales de ácido sulfónico (sulfonato). De forma similar, por "carboxi" se entiende ácido carboxílico o sales de ácido carboxílico. "Fosfato", como se usa en la presente memoria, es un éster de ácido fosfórico, e incluye sales de fosfato. "Fosfonato", como se usa en la

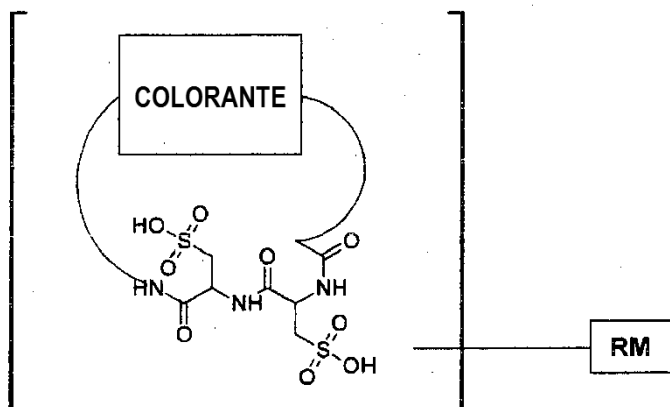
presente memoria, significa ácido fosfónico e incluye sales de fosfonato. Además, "sulfonato" y "fosfonato" son intercambiables con "sulfonilo" y "fosfonilo" respectivamente. Como se usa en la presente memoria, salvo que se especifique de otra forma, las partes alquilo de los sustituyentes tales como alquilo, alcoxi, arilalquilo, alilamino, dialquilamino, trialquilamino o perfluoroalquilo son opcionalmente saturadas, insaturadas, lineales o ramificadas, y todos los sustituyentes alquilo, alcoxi, alquilamino y dialquilamino están ellos mismos opcionalmente sustituidos además con carboxi, sulfonato, amino o hidroxilo.

5

Otro WSB preferido es un péptido que contiene al menos dos restos solubles en agua derivados de grupo sulfoalquilo, sulfoarilo, sulfoheteroarilo, fosfonilalquilo, fosfonilarilo o fosfoniheteroarilo. Otro WSB preferido contiene un resto tiofeno. Otro WSB contiene un RM.

10 El COLORANTE es como se define en las reivindicaciones.

Otra realización preferida es un compuesto de fórmula 2

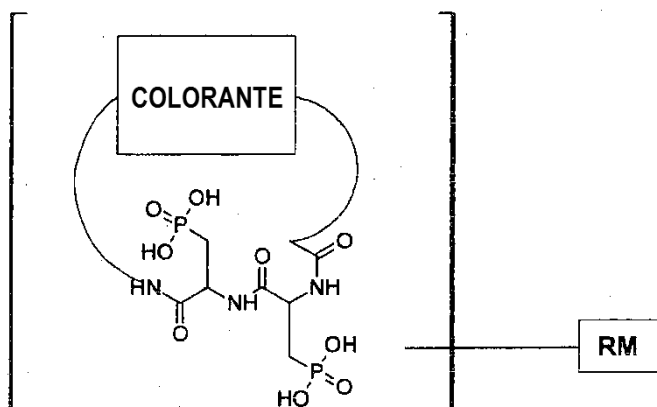


Fórmula 2

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente. RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

15

Otra realización preferida es un compuesto de fórmula 3

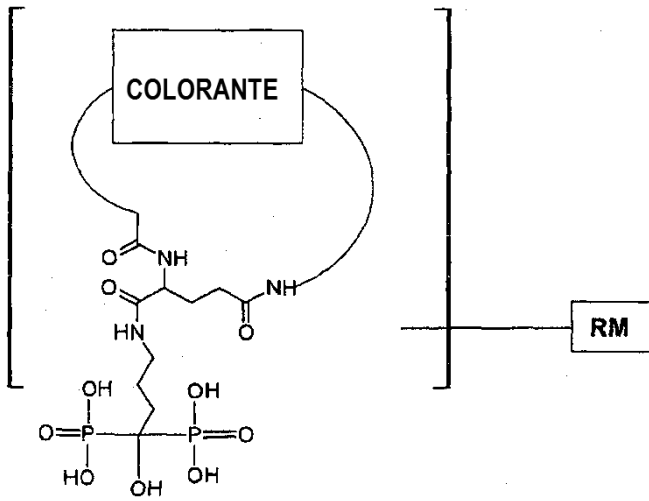


Fórmula 3

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente. RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

20

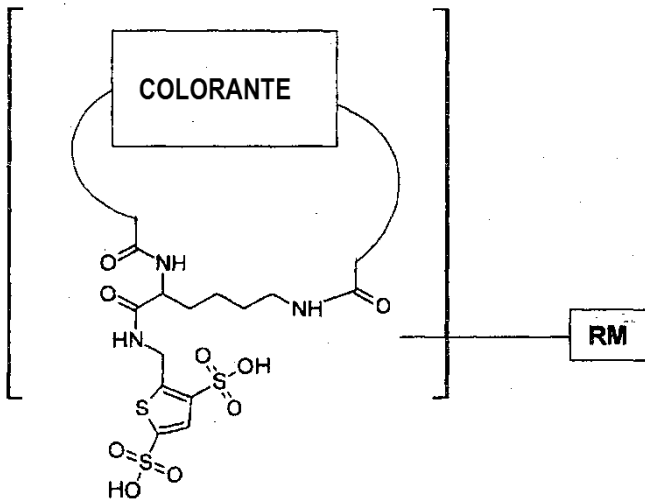
Otra realización preferida es un compuesto de fórmula 4



Fórmula 4

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente. RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

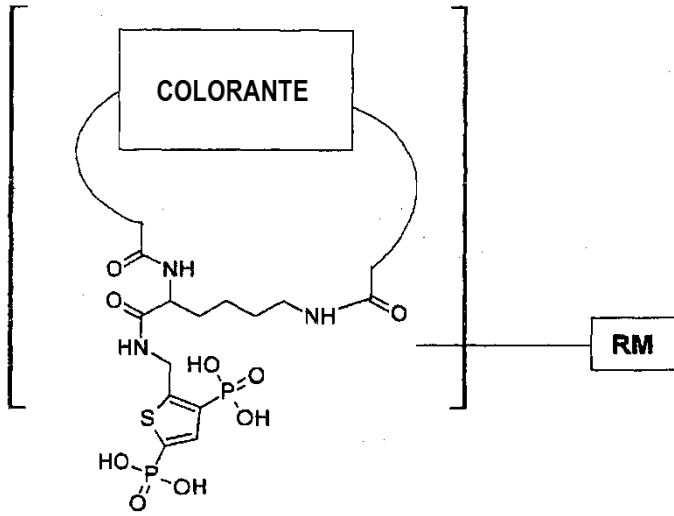
- 5 Otra realización preferida es un compuesto de fórmula 5



Fórmula 5

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente. RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

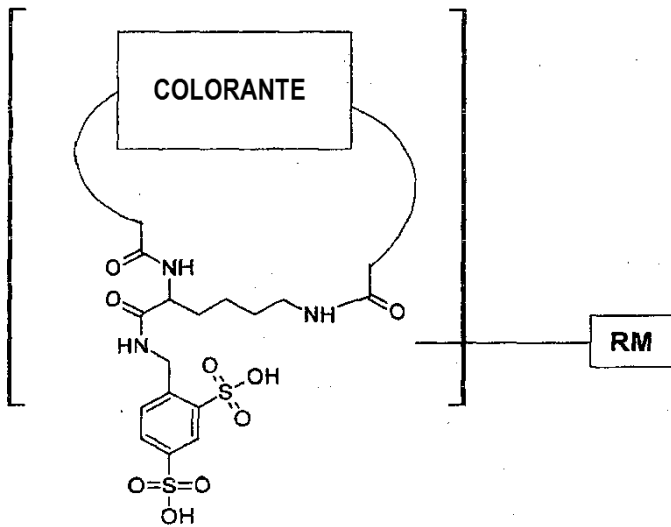
- 10 Otra realización preferida es un compuesto de fórmula 6



Fórmula 6

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente. RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

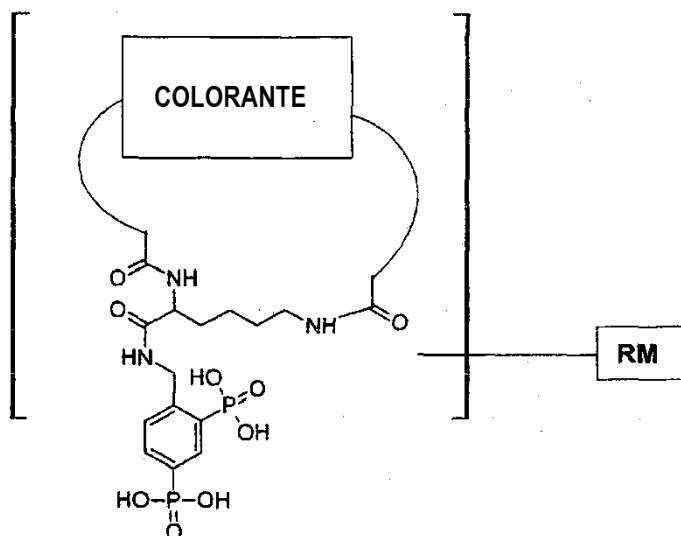
- 5 Otra realización preferida es un compuesto de fórmula 7



Fórmula 7

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente. RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

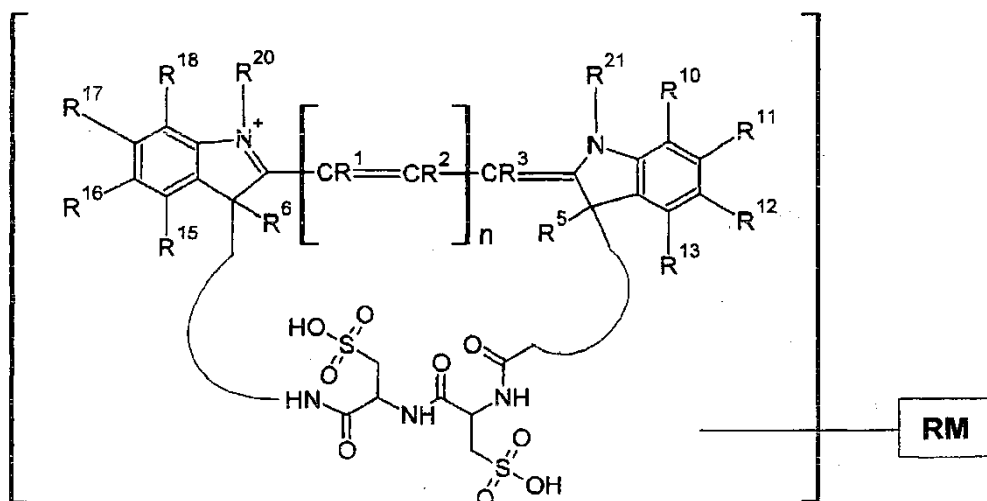
- 10 Otra realización preferida es un compuesto de fórmula 8



Fórmula 8

en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente. RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

5 Se describe además un compuesto de fórmula 9:



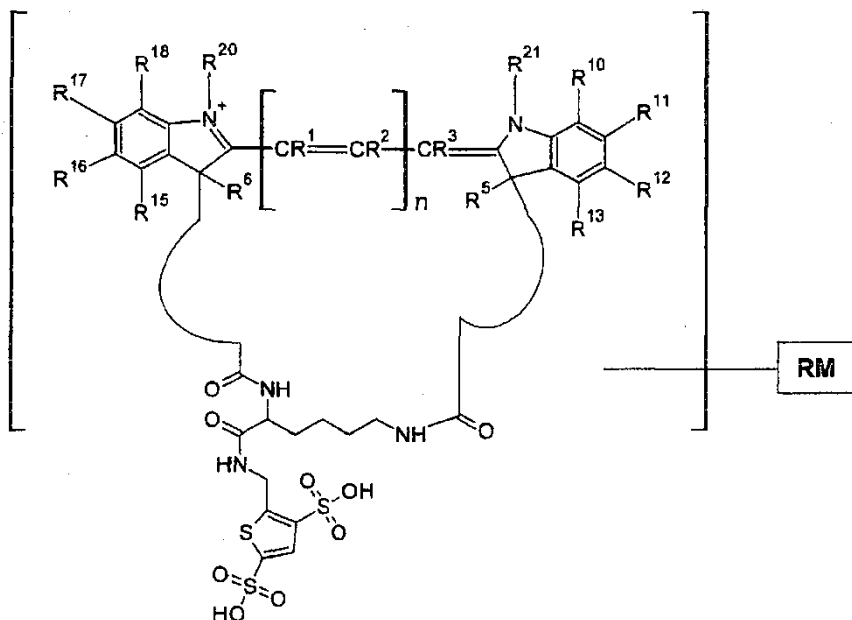
Fórmula 9

10 en donde de R^1 a R^3 son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; R^5 y R^6 son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; de R^{10} a R^{19} son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo o un RM; R^{20} y R^{21} son independientemente un alquilo, un arilalquilo, un alcoxialquilo, un polietilenglicol o un RM; uno o más de R^{10} y R^{21} , R^{10} y R^{11} , R^{11} y R^{12} , R^{12} y R^{13} , R^5 y R^{13} , R^6 y R^{15} , R^{15} y R^{16} , R^{16} y R^{17} , R^{17} y R^{18} , o R^{18} y R^{20} opcionalmente se toman en combinación para formar un cicloalquilo, un heteroanillo, un arilo o un anillo de heteroarilo; RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante; n es de 0 a 3.

15 La longitud del puente de polimetilo conjugado entre los dos sistemas de anillos afecta mucho a las propiedades de absorción y emisión del colorante. Cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , cuando está presente, es independientemente un hidrógeno, un flúor, un cloro, un alquilo que tiene 1-6 carbonos, un alcoxi que tiene 1-6 carbonos, un arilo, un ariloxi, un resto N-heteroaromático, o un ion iminio. Alternativamente, dos sustituyentes R_1/R_2 , R_2/R_3 , cuando se toman en combinación forman un anillo hidrocarbonado saturado o insaturado de 4, 5 o 6 miembros que no está sustituido o está opcionalmente sustituido una o más veces con un alquilo saturado o insaturado que tiene 1-6 carbonos, un halógeno, o un oxígeno carbonílico. Típicamente, cada uno de R_1 , R_2 y R_3 , cuando está presente, es un hidrógeno. Cuando uno de R_1 , R_2 y R_3 no es un hidrógeno, típicamente es el sustituyente en el carbono central de los dobles

enlaces del puente y conjugados. De forma similar, cuando los dobles enlaces del puente y conjugados incorporan un anillo de 4, 5 o 6 miembros, típicamente ocurre en el centro del resto del puente conjugado.

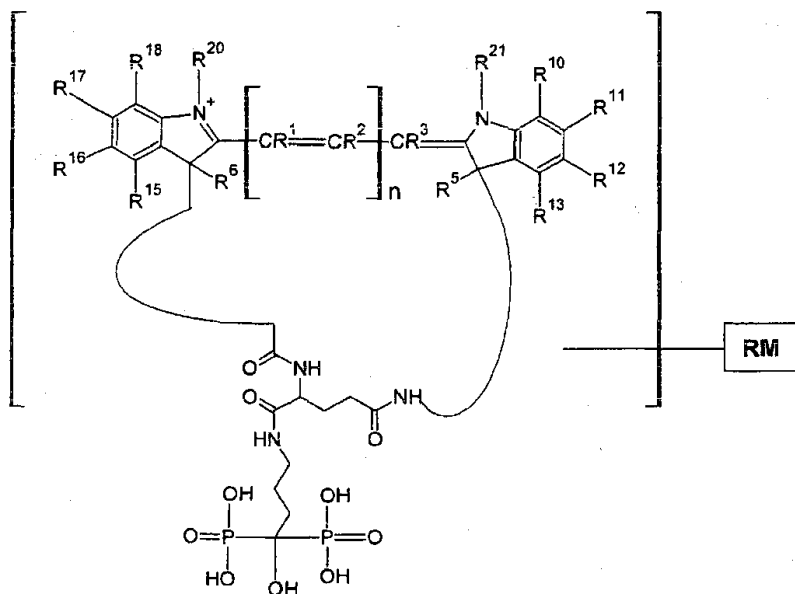
Se describe además un compuesto de fórmula 10:



5 Fórmula 10

en donde de R¹ a R³ son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; R⁵ y R⁶ son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; de R¹⁰ a R¹⁹ son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metililo, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo o un RM; R²⁰ y R²¹ son independientemente un alquilo, un arilalquilo, un alcoxilalquilo, un polietilenglicol o un RM; uno o más de R¹⁰ y R²¹, R¹⁰ y R¹¹, R¹¹ y R¹², R¹² y R¹³, R⁵ y R¹³, R⁶ y R¹⁵, R¹⁵ y R¹⁶, R¹⁶ y R¹⁷, R¹⁷ y R¹⁸, o R¹⁸ y R²⁰ opcionalmente se toman en combinación para formar un cicloalquilo, un heteroanillo, un arilo o un anillo de heteroarilo; RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante; n es de 0 a 3.

15 Se describe además un compuesto de fórmula 11:

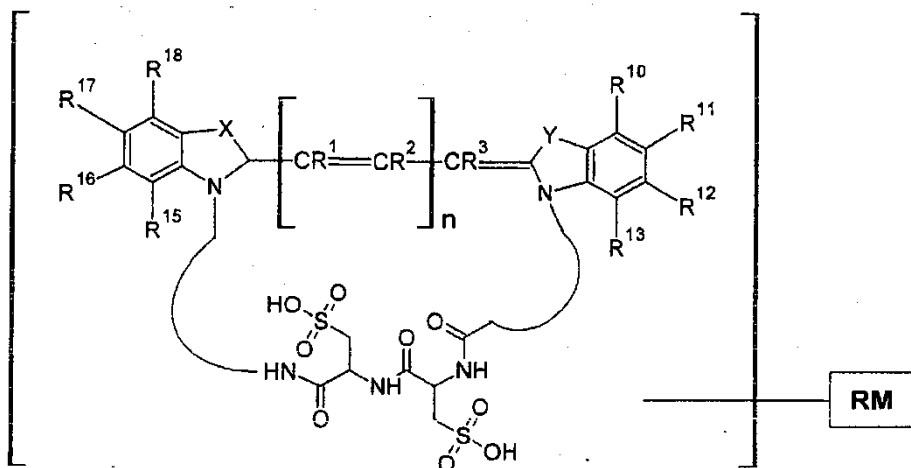


Fórmula 11

en donde de R¹ a R³ son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; R⁵ y R⁶ son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; de R¹⁰ a R¹⁹ son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, a metilitio, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo o un RM; R²⁰ y R²¹ son independientemente un alquilo, un arilalquilo, un alcoxilalquilo, un polietilenglicol o un RM; uno o más de R¹⁰ y R²¹, R¹⁰ y R¹¹, R¹¹ y R¹², R¹² y R¹³, R⁵ y R¹³, R⁶ y R¹⁵, R¹⁵ y R¹⁶, R¹⁶ y R¹⁷, R¹⁷ y R¹⁸, o R¹⁸ y R²⁰ opcionalmente se toman en combinación para formar un cicloalquilo, un heteroanillo, un arilo o un anillo de heteroarilo; RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante; n es de 0 a 3.

5

10 Se describe además un compuesto de fórmula 12:



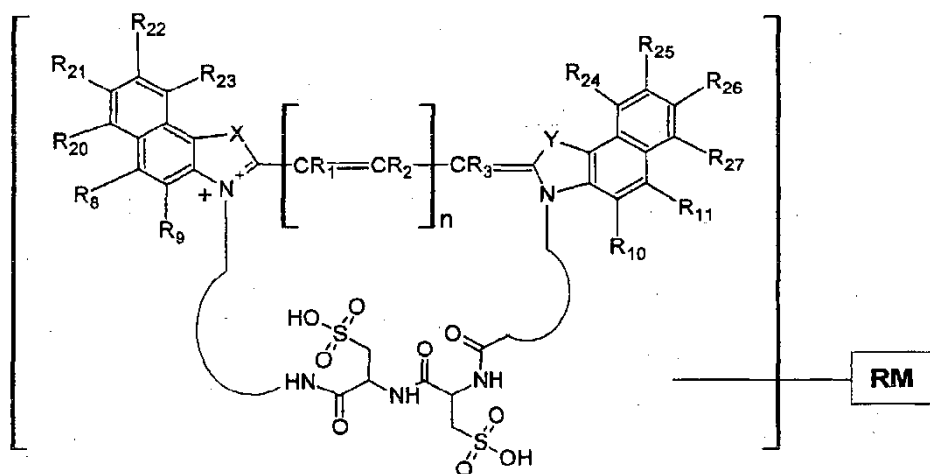
Fórmula 12

en donde X e Y son independientemente O, S, Se o CR²⁰R²¹; de R¹ a R³ son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; R⁵ y R⁶ son independientemente un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; de R¹⁰ a R¹⁹ son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo o un RM; R²⁰ y R²¹ son independientemente un alquilo, un arilalquilo, un alcoxilalquilo, un polietilenglicol o un RM; uno o más de R¹⁰ y R²⁰, R¹⁰ y R²¹, R¹⁰ y R¹¹, R¹¹ y R¹², R¹² y R¹³, R¹⁵ y R¹⁶, R¹⁶ y R¹⁷, R¹⁷ y R¹⁸, o R¹⁸ y R²⁰, R¹⁸ y R²¹ opcionalmente se toman en combinación para formar un cicloalquilo, un heteroanillo, un arilo o un anillo de heteroarilo; RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante; n es de 0 a 3.

15

20

Se describe además un compuesto de fórmula 13

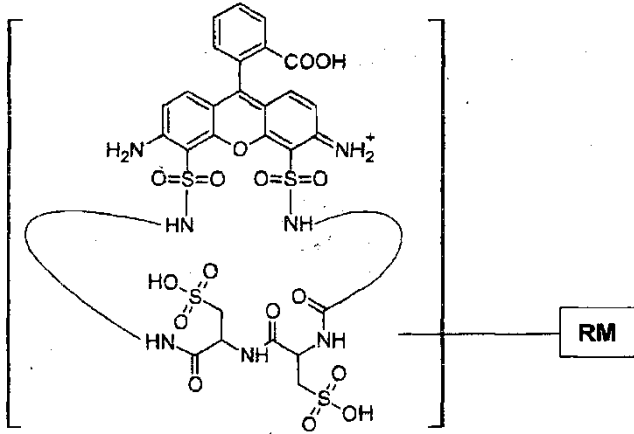


Fórmula 13

25 en donde X e Y son independientemente O, S, Se o CR³⁰R³¹; n es de 0 a 3; de R¹ a R³ son independientemente un hidrógeno, un halógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un arilo, un heteroarilo o un RM; de R⁸ a R²⁷ son

independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilo, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo o un RM; R^{30} y R^{31} son independientemente un alquilo, un arilalquilo, un alcoxialquilo, un polietilenglicol o un RM; RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

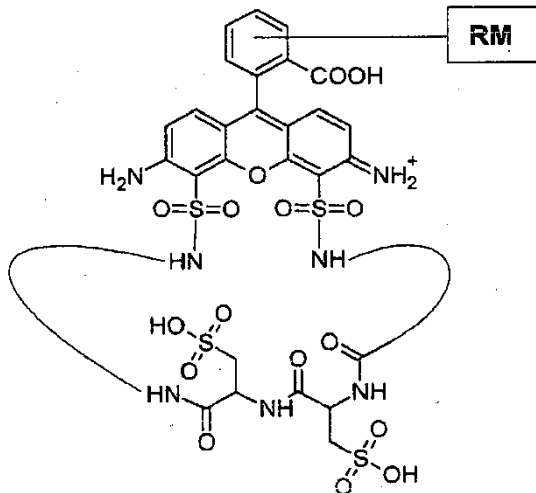
5 Se describe además un compuesto de fórmula 14



Fórmula 14

en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

Se describe además un compuesto de fórmula 15

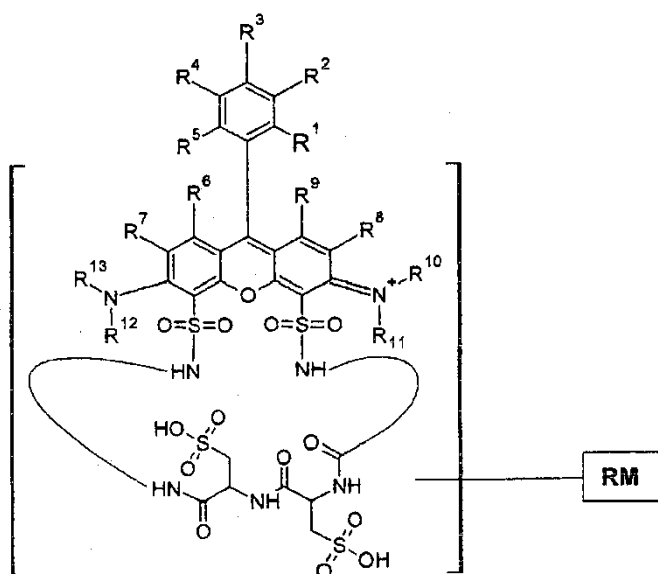


10

Fórmula 15

en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

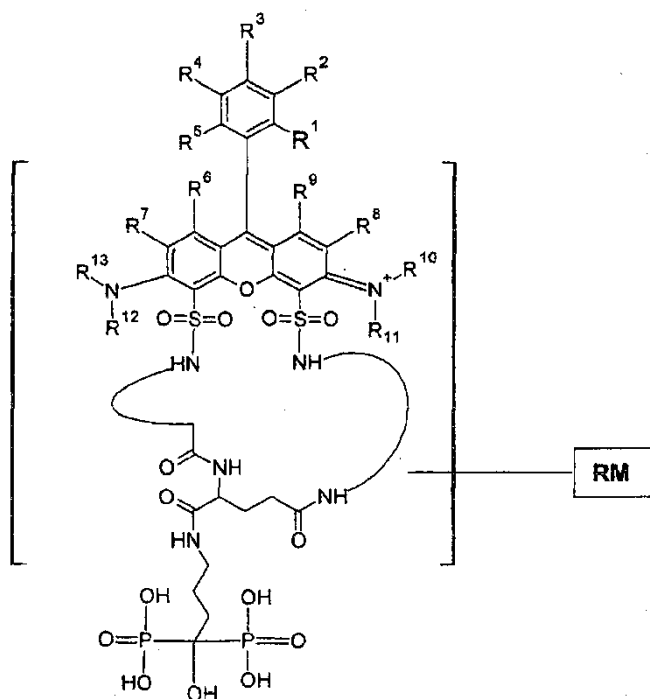
Se describe además un compuesto de fórmula 16



Fórmula 16

5 en donde R¹ es hidrógeno, alquilo, alcoxi, carboxi o sulfo; de R² a R⁹ son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, a metiltio, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo o un RM; R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ son independientemente un alquilo, un alquilo halogenado, un arilalquilo, un alcoxialquilo, un polietilenglicol o un RM; uno o más de R⁶ y R⁷, R⁸ y R⁹, R⁸ y R¹⁰, o R⁷ y R¹³ considerados en combinación forman un anillo de 5 a 8 miembros; RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

Se describe además un compuesto de fórmula 17



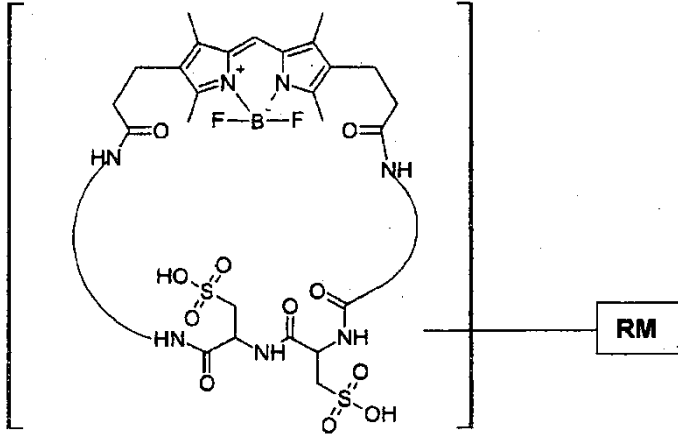
10

Fórmula 17

15 en donde R¹ es hidrógeno, alquilo, alcoxi, carboxi o sulfo; de R² a R⁹ son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, a metiltio, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo o un RM; R¹⁰, R¹¹, R¹² y R¹³ son independientemente un alquilo, un alquilo halogenado, un arilalquilo, un alcoxialquilo, un

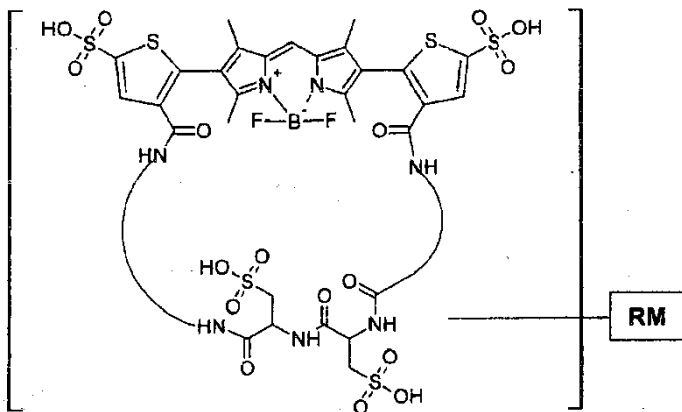
polietilenglicol o un RM; uno o más de R⁶ y R⁷, R⁸ y R⁹, R⁸ y R¹⁰, o R⁷ y R¹³ considerados en combinación forman un anillo de 5 a 8 miembros; RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

Se describe además un compuesto de fórmula 18



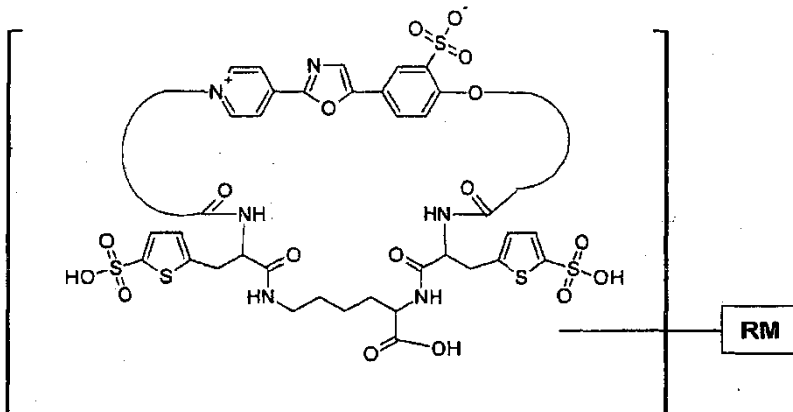
- 5 Fórmula 18
 en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

Se describe además un compuesto de fórmula 19



- Fórmula 19
 10 en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

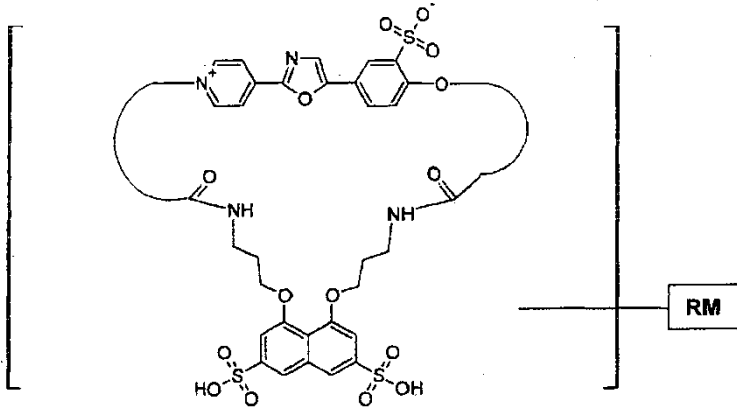
Una realización preferida de la invención es un compuesto de fórmula 20



Fórmula 20

en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

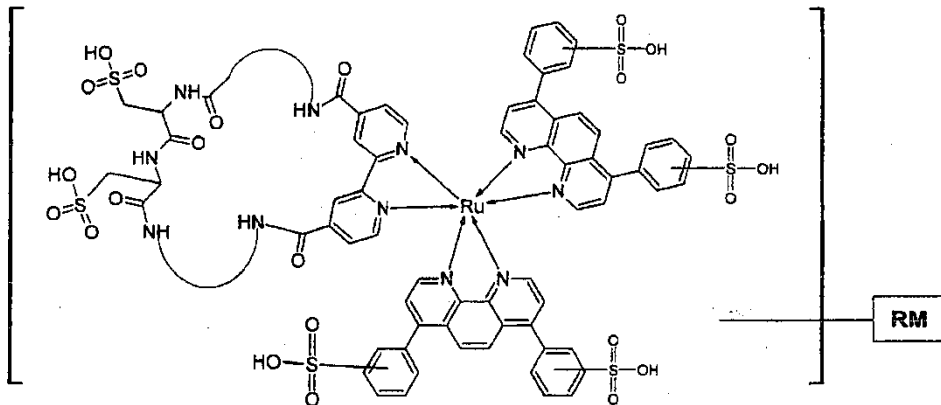
Otra realización preferida de la invención es un compuesto de fórmula 21



Fórmula 21

5 en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

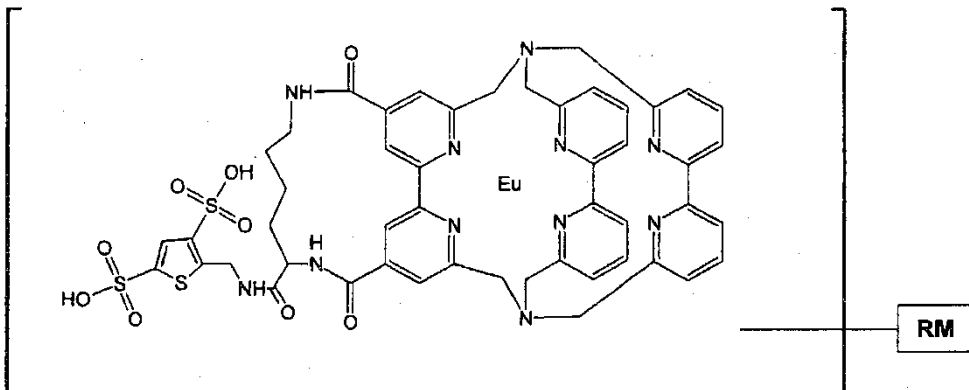
Se describe además un compuesto de fórmula 22



Fórmula 22

en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

10 Se describe además un compuesto de fórmula 23



Fórmula 23

en donde RM es un resto químicamente reactivo descrito más adelante.

Muchas realizaciones de los compuestos de la invención tienen una carga electrónica global. Debe entenderse que cuando se muestra que dichas cargas electrónicas están presentes, están equilibradas por la presencia de contraiones adecuados, que pueden estar identificados explícitamente o no. Un contraión biológicamente compatible, que es preferido para algunas aplicaciones, es no tóxico en aplicaciones biológicas, y no tiene un efecto sustancialmente perjudicial en las biomoléculas. Cuando el compuesto de la invención tiene carga positiva, el contraión típicamente se selecciona de cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, alcanosulfonato, arilsulfonato, fosfato, perclorato, tetrafluoroborato, tetraarilboruro, nitrato y aniones de ácidos carboxílicos aromáticos y alifáticos. Cuando el compuesto de la invención tiene carga negativa, el contraión típicamente se selecciona de iones de metales alcalinos, iones de metales alcalinotérreos, iones de metales de transición, iones amonio o amonio sustituido o piridinio. Preferiblemente, cualquier contraión necesario es biológicamente compatible, es no tóxico cuando se usa, y no tiene un efecto sustancialmente perjudicial en biomoléculas. Los contraiones se cambian fácilmente por métodos bien conocidos en la técnica, tales como cromatografía de intercambio iónico o precipitación selectiva.

Debe entenderse que los colorantes de la invención se han representado en una u otra estructura de resonancia electrónica particular. Cada aspecto de la presente invención se aplica igualmente a colorantes que se representan formalmente con otras estructuras de resonancia permitidas, ya que la carga electrónica en los presentes colorantes está deslocalizada a lo largo del propio colorante.

Como se usa en la presente memoria, un "resto reactivo", indicado "RM", se refiere a un resto en un compuesto que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional en un compuesto diferente para formar un enlace covalente.

En una realización de la invención, el colorante contiene al menos un RM, donde RM es el resto reactivo que está unido al colorante por una unión covalente L. En algunas realizaciones, la unión covalente que une el colorante a RM contiene múltiples átomos intermedios que sirven como un espaciador. Los colorantes con un RM marcan una amplia variedad de sustancias orgánicas o inorgánicas que contienen o son modificadas para contener grupos funcionales con reactividad adecuada, que dan como resultado la unión química de la sustancia conjugada. Como se usa en la presente memoria, resto reactivo "RM" significa un resto en el compuesto que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional en un compuesto diferente para formar una unión covalente. Típicamente el resto reactivo es un electrófilo o nucleófilo que puede formar una unión covalente por la exposición al correspondiente grupo funcional que es un nucleófilo o electrófilo, respectivamente. Alternativamente, el resto reactivo es un grupo fotoactivable, y se convierte en químicamente reactivo solo después de iluminación con luz de una longitud de onda adecuada. Típicamente, la reacción de conjugación entre el colorante reactivo y la sustancia con la que se va a conjugar, da como resultado la incorporación de uno o más átomos del resto reactivo RM en una nueva unión L que une el colorante con la sustancia conjugada. Los ejemplos seleccionados de restos reactivos y uniones se muestran en la tabla 1, donde la reacción de un grupo electrófilo y un grupo nucleófilo da un enlace covalente.

Tabla 1. Ejemplos de RM que se usan para preparar uniones covalentes

Grupo electrófilo	Grupo nucleófilo	Conjugado resultante
ésteres activados*	aminas/anilinas	carboxamidas
acrilamidas	tioles	tioéteres
acil-azidas**	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de acilo	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de acilo	alcoholes/fenoles	ésteres
acil-nitrilos	alcoholes/fenoles	ésteres
acil-nitrilos	aminas/anilinas	carboxamidas
aldehídos	aminas/anilinas	iminas
aldehídos o cetonas	hidrazinas	hidrazonas
aldehídos o cetonas	hidroxilaminas	oximas
haluros de alquilo	aminas/anilinas	alquil aminas
haluros de alquilo	ácidos carboxílicos	ésteres
haluros de alquilo	tioles	tioéteres
haluros de alquilo	alcoholes/fenoles	éteres
sulfonatos de alquilo	tioles	tioéteres
sulfonatos de alquilo	ácidos carboxílicos	ésteres
sulfonatos de alquilo	alcoholes/fenoles	éteres
anhídridos	alcoholes/fenoles	ésteres
anhídridos	aminas/anilinas	carboxamidas
haluros de arilo	tioles	tioéteres
haluros de arilo	aminas	arilaminas
aziridinas	tioles	tioéteres
boronatos	glicoles	ésteres de boronato
carbodiimidas	ácidos carboxílicos	N-acilureas o anhídridos

Grupo electrófilo	Grupo nucleófilo	Conjugado resultante
diazoalcanos	ácidos carboxílicos	ésteres
epóxidos	tioles	tioéteres
haloacetamidas	tioles	tioéteres
halogenoplatinato	amino	complejo de platino
halogenoplatinato	heterociclo	complejo de platino
halogenoplatinato	tiol	complejo de platino
halogenotriazinas	aminas/anilinas	aminotriazinas
halogenotriazinas	alcoholes/fenoles	éteres de triazinilo
imido ésteres	aminas/anilinas	amidinas
isocianatos	aminas/anilinas	ureas
isocianatos	alcoholes/fenoles	uretanos
isotiocianatos	aminas/anilinas	tioureas
maleimidias	tioles	tioéteres
fosforamiditas	alcoholes	ésteres de fosfiro
haluros de sililo	alcoholes	éteres de sililo
ésteres de sulfonato	aminas/anilinas	alquilaminas
ésteres de sulfonato	tioles	tioéteres
ésteres de sulfonato	ácidos carboxílicos	ésteres
ésteres de sulfonato	alcoholes	éteres
haluros de sulfonilo	aminas/anilinas	sulfonamidas
haluros de sulfonilo	fenoles/alcoholes	ésteres de sulfonato

*Ésteres activados, como se entiende en la técnica, en general tienen la fórmula -COL, donde L es un buen grupo saliente (p. ej. succinimidiloxi (-ONC₄H₄O₂) sulfosuccinimidiloxi (-ONC₄H₃O₂-SO₃H), -1-oxibenzotriazolilo (-OC₆H₄N₃); o un grupo ariloxi o ariloxi sustituido una o más veces con sustituyentes atractores de electrones tales como nitro, fluoro, cloro, ciano o trifluorometilo, o combinaciones de los mismos, usados para formar ésteres de arilo activados; o un ácido carboxílico activado por una carbodiimida para formar un anhídrido o anhídrido mixto -OCOAlk o -OCN(Alk₁)NH(Alk₂), donde Alk₁ y Alk₂, que pueden ser iguales o diferentes, son alquilo C₁-C₂₀, perfluoroalquilo C₁-C₂₀, o alcoxi C₁-C₂₀; o ciclohexilo, 3-dimetilaminopropilo o N-morfolinoetilo).

**Las acil-azidas también se pueden transponer a isocianatos.

- 10 La elección del resto reactivo usado para unir el colorante a la sustancia que se va a conjugar típicamente depende del grupo funcional en la sustancia que se va a conjugar y del tipo o longitud de unión covalente deseado. Los tipos de grupos funcionales típicamente presentes en las sustancias orgánicas o inorgánicas incluyen aminas, amidas, tioles, alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas, fosfonatos, imidazoles, hidrazinas, hidroxilaminas, aminas disustituidas, haluros, epóxidos, ésteres de carboxilato, ésteres de sulfonato, purinas, pirimidinas, ácidos
- 15 carboxílicos, enlaces olefínicos, o una combinación de estos grupos. Puede estar disponible un solo tipo de sitio reactivo en la sustancia (típico para polisacáridos), o puede haber una variedad de sitios (p. ej. aminas, tioles, alcoholes, fenoles), como es típico para las proteínas. Una sustancia conjugada se puede conjugar con más de un colorante, que puede ser el mismo o diferente, o con una sustancia que está adicionalmente modificada por un hapteno, tal como biotina. Aunque se puede obtener alguna selectividad por el control cuidadoso de las condiciones
- 20 de reacción, la selectividad del marcaje se obtiene mejor por selección de un colorante reactivo adecuado.

Típicamente, el RM reaccionará con una amina, un tiol, un alcohol, un aldehído o una cetona. Preferiblemente, el RM reacciona con un grupo funcional amina o tiol. En una realización, el RM es una acrilamida, una amina reactiva (que incluye una cadaverina o etilendiamina), un éster activado o un ácido carboxílico (típicamente un éster de succinimidilo o un ácido carboxílico), una acil-azida, un acil-nitrilo, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido,

25 una anilina, un haluro de arilo, una azida, una aziridina, un boronato, un ácido carboxílico, un diazoalcano, una halogenoacetamida, una halogenotriazina, una hidrazina (incluyendo hidrazidas), un imido-éster, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, una fosforamidita, un complejo de platino reactivo, un haluro de sulfonilo o un grupo tiol. Por "complejo de platino reactivo" se entiende en particular complejos de platino químicamente reactivos tales como se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.580.990; 5.714.327; 5.985.566.

- 30 Cuando el resto reactivo es un grupo fotoactivable, tal como una azida, diazirinilo, azidoarilo o derivado de psoraleno, el colorante se vuelve químicamente reactivo solo después de iluminación con luz de una longitud de onda adecuada. Cuando el RM es un éster activado de un ácido carboxílico, el colorante reactivo es particularmente útil para preparar conjugados de colorantes de proteínas, nucleótidos, oligonucleótidos o haptenos. Cuando el RM es una maleimida o halogenoacetamida, el colorante reactivo es particularmente útil para la conjugación con sustancias
- 35 que contienen tiol. Cuando el RM es una hidrazida, el colorante reactivo es particularmente útil para la conjugación con hidratos de carbono oxidados con peryodato y glucoproteínas, y además es un trazador polar fijable a aldehído para la microinyección de células. Preferiblemente, el RM es un ácido carboxílico, un éster de succinimidilo o un ácido carboxílico, una halogenoacetamida, una hidrazina, un isotiocianato, un grupo maleimida, una amina alifática,

un perfluorobenzamido, un grupo azidoperfluorobenzamido o un psoraleno. Más preferiblemente, el RM es un éster de succinimidilo o un ácido carboxílico, una maleimida, una yodoacetamida o un complejo de platino reactivo.

5 Basándose en los atributos mencionados antes, los colorantes reactivos adecuados de la invención se seleccionan para la preparación de los conjugados de colorantes deseados, cuyas propiedades ventajosas los hacen útiles para una amplia variedad de aplicaciones. De acuerdo con la invención, el sustrato es una sustancia biológica que tiene un peso molecular mayor que 1000 daltons.

10 Los conjugados de colorantes particularmente útiles incluyen, entre otros, conjugados donde el sustrato es un péptido, un nucleótido, un antígeno, un esteroide, una vitamina, un fármaco, un hapteno, un metabolito, una toxina, un contaminante medioambiental, un aminoácido, una proteína, un ácido nucleico, un polímero de ácido nucleico, un hidrato de carbono, un lípido, un resto de formación de complejo con iones, un vidrio o un polímero no biológico. Alternativamente, el sustrato es una célula, un sistema celular, un fragmento celular o una partícula subcelular (p. ej., entre otros), una partícula vírica, una partícula bacteriana, un componente vírico, una célula biológica (tal como una célula animal, una célula vegetal, bacteria, levadura u organismo protista), o un componente celular. Los colorantes reactivos típicamente marcan grupos funcionales en la superficie celular, en membranas celulares, orgánulos o citoplasma.

15 Típicamente el sustrato es un aminoácido, un péptido, una proteína, una triamina, un polisacárido, un resto de formación de complejo con iones, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un hapteno, un psoraleno, un fármaco, una hormona, un lípido, un conjunto lipídico, un polímero, una micropartícula polimérica, una célula biológica o virus. Más típicamente, el sustrato es un péptido, una proteína, un nucleótido, un oligonucleótido o un ácido nucleico. Cuando se conjugan los colorantes de la invención con dichos biopolímeros, se pueden incorporar más colorantes por molécula para aumentar la señal fluorescente. Por ejemplo, se pueden incorporar al menos tres moléculas de dichos colorantes por molécula de anticuerpo sin pérdida de la fluorescencia total, mientras que la fluorescencia de Cy5 (en donde $n=2$) espectralmente comparable se amortigua fuertemente cuando se incorporan más de aproximadamente dos colorantes Cy5 por anticuerpo. Estos resultados confirman los problemas con los conjugados con Cy5 descritos por otros, p. ej. BIOCONJUGATE CHEM., 11, 696 (2000). Los conjugados marcados de forma óptima de la invención son típicamente mucho más fluorescentes que los conjugados del colorante Cy5 o Cy5 1,1'-reticulado en la misma concentración de anticuerpo.

20 En una realización, el sustrato es un polímero de aminoácidos tal como un péptido o proteína. Los conjugados preferidos de péptidos contienen al menos cinco aminoácidos, más preferiblemente de 5 a 36 aminoácidos. Los péptidos preferidos incluyen neuropéptidos, citoquinas, toxinas, sustratos de proteasa y sustratos de proteína quinasa. Los conjugados de proteína preferidos incluyen enzimas, anticuerpos, lectinas, glucoproteínas, histonas, albúminas, lipoproteínas, avidina, estreptavidina, proteína A, proteína G, ficobiliproteínas y otras proteínas fluorescentes, hormonas, toxinas, quininas y factores de crecimiento. En un aspecto preferido, la proteína conjugada es una ficobiliproteína, tal como alofococianina, ficocianina, ficoeritrina, alofococianina B, B-ficoeritrina, y ficoeritrocianina, (por ejemplo, véase la patente de EE.UU. nº 5.714.386 de Roederer (1998)). Son particularmente preferidos los conjugados de R-ficoeritrina y de alofococianina con colorantes seleccionados de la invención, que sirven como aceptores o donadores de energía en estado excitado. En estos conjugados, la transferencia de energía del estado excitado da como resultado la emisión de fluorescencia de longitud de onda larga cuando se excita a longitudes de onda relativamente cortas.

30 En un aspecto de la invención, el sustrato es una sustancia conjugada que es un anticuerpo (que incluye anticuerpos intactos, fragmentos de anticuerpos y sueros con anticuerpos, etc.), un aminoácido, una angiostatina o endostatina, una avidina o estreptavidina, una biotina (p. ej. una amidobiotina, una biocitina, una destiobiotina, etc.), una proteína componente de la sangre (p. ej. una albúmina, un fibrinógeno, un plasminógeno, etc.), un dextrano, una enzima, un inhibidor de enzima, una proteína de unión a IgG (p. ej. una proteína A, proteína G, proteína A/G, etc.), una proteína fluorescente (p. ej. una ficobiliproteína, una aequorina, una proteína fluorescente verde, etc.), un factor de crecimiento, una hormona, una lectina (p. ej. una aglutinina de germen de trigo, una conconavalina A, etc.), un lipopolisacárido, una proteína de unión a metal (p. ej. una calmodulina, etc.), un microorganismo o parte del mismo (p. ej. una bacteria, un virus, una levadura, etc.), un neuropéptido y otros factores biológicamente activos (p. ej. una dermorfina, una deltopina, una endomorfina, una endorfina, un factor de necrosis tumoral etc.), una micropartícula no biológica (p. ej. de ferrofluido, oro, poliestireno, etc.), un nucleótido, un oligonucleótido una toxina peptídica (p. ej. una apamina, una bungarotoxina, una faloidina, etc.), una proteína de unión a fosfolípido (p. ej. una anexina, etc.), un fármaco molécula pequeña (p. ej. a metotrexato, etc.), una proteína estructural (p. ej. una actina, una fibronectina, una laminina, una proteína asociada a microtúbulos, una tubulina, etc.), o una tiramida.

35 En otra realización, el sustrato es una base de ácido nucleico, nucleósido, nucleótido o un polímero de ácido nucleico, que incluyen lo que son modificados para tener un conector o espaciador adicional para la unión de los colorantes de la invención, tal como una unión alquínilo (patente de EE.UU. nº 5.047.519), una unión aminoalilo (patente de EE.UU. nº 4.711.955), o un conector sustituido con heteroátomo (patente de EE.UU. nº 5.684.142) u otras uniones. En otra realización, la sustancia conjugada es un nucleósido o análogo de nucleótido que une una base de purina o pirimidina a un resto fosfato o polifosfato por un espaciador no cíclico. En otra realización, el colorante se conjuga con una parte de hidrato de carbono de un nucleótido o nucleósido, típicamente por un grupo hidroxilo, pero adicionalmente por un grupo tiol o amino (patente de EE.UU. nº 5.659.025; 5.668.268; 5.679.785).

Típicamente, el nucleótido conjugado es un trifosfato de nucleósido o un trifosfato de desoxinucleósido o un trifosfato de didesoxinucleósido. La incorporación de restos metileno o heteroátomos nitrógeno o azufre en el resto de fosfato o polifosfato también es útil. Las bases no purinas y no pirimidinas tales como 7-desazapurinas (patente de EE.UU. nº 6.150.510) y los ácidos nucleicos que contienen dichas bases, también se pueden acoplar con los colorantes de la invención. Los aductos de ácidos nucleicos preparados por reacción de ácidos nucleicos despurinados con derivados de amina, hidrazida o hidroxilamina proporcionan medios adicionales de marcaje y detección de ácidos nucleicos, p. ej. Atamna et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 97, 686-691 (2000).

Los conjugados de polímeros de ácidos nucleicos preferidos son ADN o ARN, oligonucleótidos de ADN o ARN, o híbridos de ADN/ARN naturales o sintéticos, de una o múltiples cadenas, marcados, o incorporan un conector no habitual tal como fosfatos derivatizados con morfolina o ácidos nucleicos peptídicos tales como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. Cuando el ácido nucleico es un oligonucleótido sintético, típicamente contiene menos de 50 nucleótidos, más típicamente menos de 25 nucleótidos. Los conjugados de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Nielsen, et al. patente de EE.UU. nº 5.539.082) pueden ser preferidos para algunas aplicaciones debido a sus velocidades de hibridación generalmente más rápidas.

En una realización, los oligonucleótidos conjugados de la invención son aptámeros para una molécula diana particular, tal como un metabolito, colorante, hapteno o proteína. Es decir, el oligonucleótido se ha seleccionado para unirse preferiblemente a la molécula diana. Los métodos para preparar y cribar aptámeros para una molécula diana dada se han descrito previamente y se conocen en la técnica, p. ej., patente de EE.UU. nº 5.567.588 de Gold (1996).

En otra realización, el sustrato es un hidrato de carbono que típicamente es un polisacárido, tal como un dextrano, heparina, glucógeno, amilopectina, manano, inulina, almidón, agarosa y celulosa. Alternativamente, el hidrato de carbono es un polisacárido que es un lipopolisacárido. Los conjugados de polisacáridos preferidos son dextrano o conjugados de lipopolisacáridos.

Los conjugados que tienen un resto de formación de complejo con iones sirven como indicadores para el calcio, sodio, magnesio, cinc, potasio u otros iones metálicos biológicamente importantes. Los restos de formación de complejo con iones preferidos son éteres corona (patente de EE.UU. nº 5.405.975); derivados de ácido 1,2-bis-(2-aminofenoxietano)-N,N,N',N'-tetraacético (agentes de quelación BAPTA; patente de EE.UU. nº 5.453.517; 5.516.911 y 5.049.673); derivados de ácido 2-carboximetoxianilina-N,N-di-acético (agentes de quelación APTRA; AM. J. PHYSIOL., 256, C540 (1989)); o agentes de quelación de iones metálicos basados en piridina y fenantrolina (patente de EE.UU. nº 5.648.270); o derivados de ácido nitrilotriacético, p. ej. McMahan et al., ANAL. BIOCHEM., 236, 101-106 (1996). Preferiblemente, el resto de formación de complejo con iones es un agente quelante éter corona, un agente quelante BAPTA, un agente quelante APTRA o un derivado de ácido nitrilotriacético.

Se describen además conjugados de materiales no biológicos que incluyen conjugados de colorantes de polímeros orgánicos o inorgánicos, películas poliméricas, obleas poliméricas, membranas poliméricas, partículas poliméricas o micropartículas poliméricas (microesferas magnéticas y no magnéticas); partículas de hierro, oro o plata; metales conductores y no conductores y no metales; y superficies y partículas de vidrio y plástico. Los conjugados se preparan opcionalmente por copolimerización de un colorante que contiene un grupo funcional adecuado mientras se prepara el polímero, o por modificación química de un polímero que contiene grupos funcionales con reactividad química adecuada. Otros tipos de reacciones que son útiles para preparar conjugados de colorantes de polímeros incluyen polimerizaciones y copolimerizaciones catalizadas de alquenos y reacciones de dienos con dienófilos, transesterificaciones o transaminaciones. En otra realización, la sustancia conjugada es un vidrio o sílice, que se puede formar en una fibra óptica u otra estructura.

En otra realización, los conjugados de polímeros biológicos tales como péptidos, proteínas, oligonucleótidos, polímeros de ácidos nucleicos, también se marcan con al menos un segundo colorante luminiscente, que es opcionalmente un colorante adicional de la presente invención, para formar una pareja de transferencia de energía. En algunos aspectos de la invención, el conjugado marcado funciona como un sustrato enzimático, y la hidrólisis enzimática altera la transferencia de energía. En otra realización de la invención, la pareja de transferencia de energía que incorpora un colorante de la invención se conjuga con un oligonucleótido que presenta amortiguación de fluorescencia eficiente en su conformación de horquilla (p. ej., las llamadas "balizas moleculares", Tyagi, et al., NATURE BIOTECHNOLOGY, 16,49 (1998)).

La preparación de conjugados de colorante usando colorantes reactivos está bien documentada, p. ej. Hermanson GT, BIOCOJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, New York (1996); Haugland RP, METHODS MOL. BIOL., 45, 205-21 (1995); y Brinkley, BIOCONJUGATE CHEM., 3, 2 (1992). Los conjugados resultan típicamente de mezclar colorantes reactivos adecuados y la sustancia con la que se van a conjugar en un disolvente adecuado en el que ambos son solubles. La mayoría de los colorantes de la invención son fácilmente solubles en soluciones acuosas, facilitando las reacciones de conjugación con la mayoría de los materiales biológicos. Para los colorantes reactivos que son fotoactivados, la conjugación requiere iluminación de la mezcla de reacción para activar los colorantes reactivos.

Síntesis

Los colorantes luminiscentes de la invención se pueden sintetizar fácilmente usando dos rutas diferentes. (1) Primero se prepara un reticulador de WSB. El conector WSB se puede hacer usando procedimientos químicos en fase líquida estándar. También se puede preparar por síntesis de péptidos en fase sólida estándar si el WSB tiene más de 3 grupos solubles en agua. El WSB se puede acoplar con un colorante luminiscente que contiene dos grupos funcionales. Esta estrategia se ilustra en las figuras 5, 7, 8 y 9. (2). Un WSB se acopla con un precursor de colorante luminiscente que después se condensa para dar el colorante deseado. La estrategia se ilustra en las figuras 4 y 6.

Las síntesis de los colorantes luminiscentes están bien descritas en la bibliografía. Estas estructuras básicas además se sustituyen opcionalmente, durante o después de la síntesis, para dar los correspondientes sustituyentes de colorantes como se han definido antes. Para las carbocianinas, los compuestos intermedios clave se sintetizan fácilmente por una reacción que es análoga a la síntesis de Fischer de indoles (Sundberg, "THE CHEMISTRY OF INDOLES" 1970, Academic Press; Hamer, "THE CYANINE DYES AND RELATED COMPOUNDS", 1964, John Wiley & Sons). La síntesis de los colorantes de cianina de la invención depende de la preparación inicial de la indolina intermedia clave. Licha, et al., patente de EE.UU. n° 6.083.485 (2000) describen una síntesis típica de indolina intermedia. Estas estructuras básicas opcionalmente se sustituyen más, durante o después de la síntesis, para dar los correspondientes sustituyentes de colorantes como se han definido antes. Los nuevos intermedios clave se sintetizan fácilmente por una reacción que es análoga a una síntesis de Fischer de indoles o por las condensaciones de fenilendiamina con un compuesto carbonílico. En la figura 4 se ilustra una carbocianina sustituida con WSB.

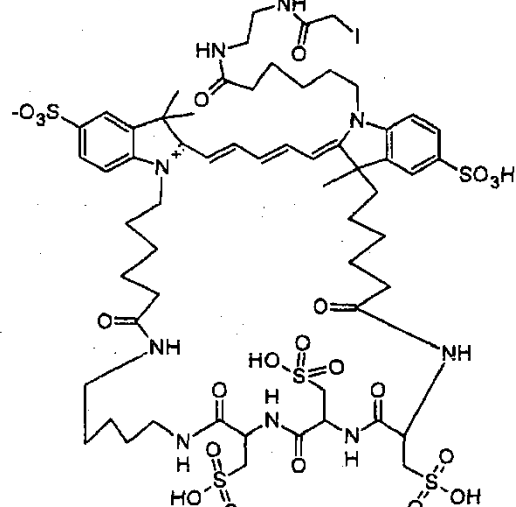
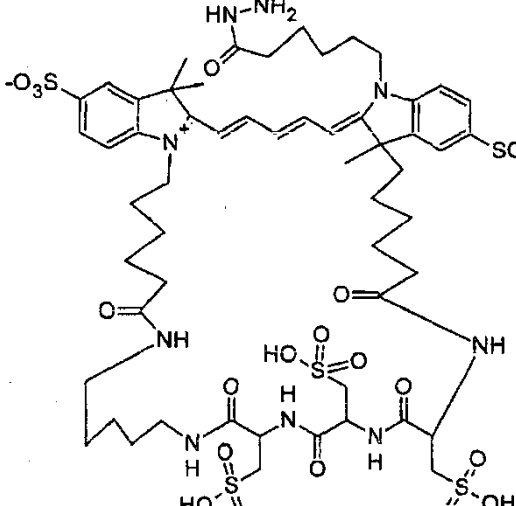
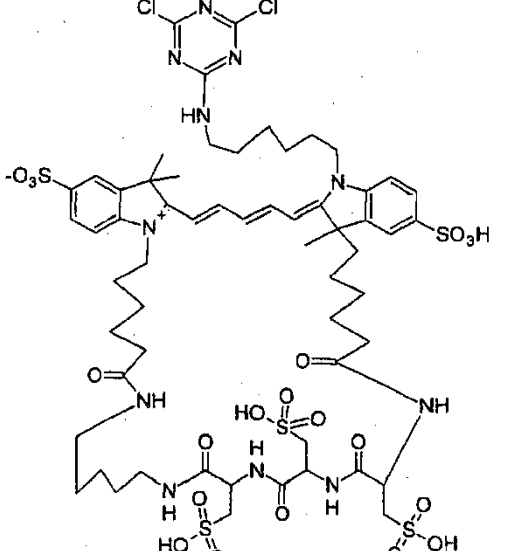
La síntesis de los colorantes de cianina de la invención, cuando la unión es en los dobles enlaces del puente y conjugados, depende de la preparación inicial de algunos compuestos intermedios del puente claves. Por ejemplo, N,N'-difenilformamida, trietilortoformiato de malonaldehído hidrocloreto de bis(fenilamina), 1,1,3-trimetoxipropano, 1,1,3,3-tetrametoxipropano y monocloruro de glutaconaldehído-dianilo, son compuestos intermedios puente bien conocidos usados en la síntesis de carbocianinas. Se han descrito previamente más ejemplos de carbocianinas adecuadas que tienen dobles enlaces en puente y conjugados, en la bibliografía de patente de EE.UU. n° 7.465.810 de Diwu et al; patente de EE.UU. n° 5.831.098 de Ollmann, Jr (1998); patente de EE.UU. n° 6.086.737 de Patonay, et al. (2000); patente de EE.UU. n° 6.048.982 de Waggoner (2000); y patente de EE.UU. n° 5.453.505 de Lee, et al. (1995); patente de EE.UU. n° 5.639.874 de Middendorf, et al. (1997); patente de EE.UU. n° 3.864.644 de Lincoln, et al. (1975); patente de EE.UU. n° 4.011.086 de Simson (1977). La síntesis total típica de carbocianinas sustituidas en los átomos de carbono del puente y conjugados con un RM se ilustra en las figuras 4, 5 y 6.

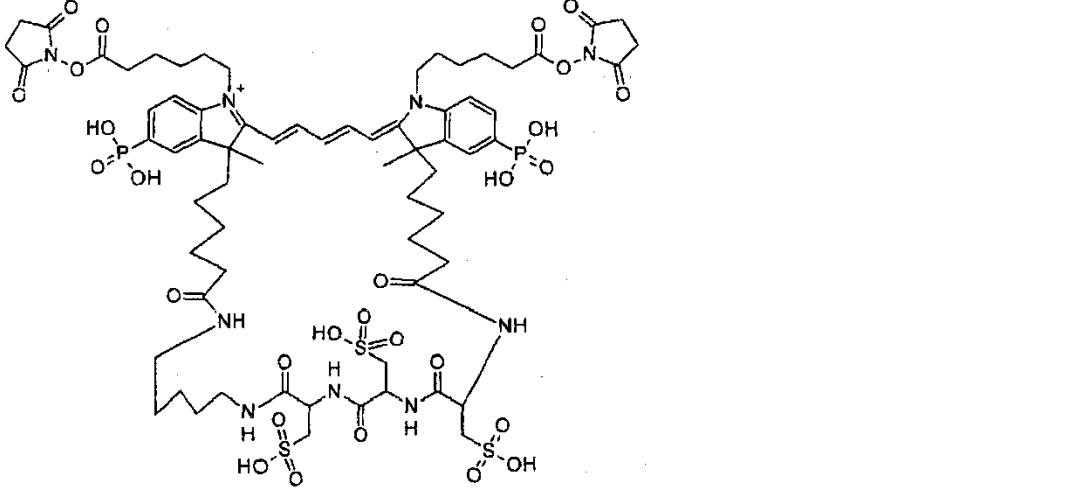
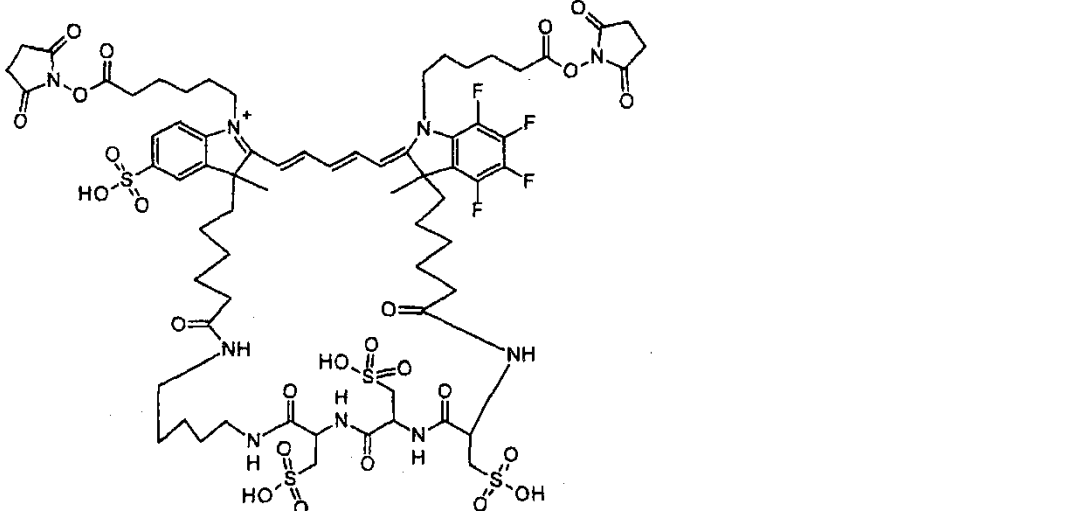
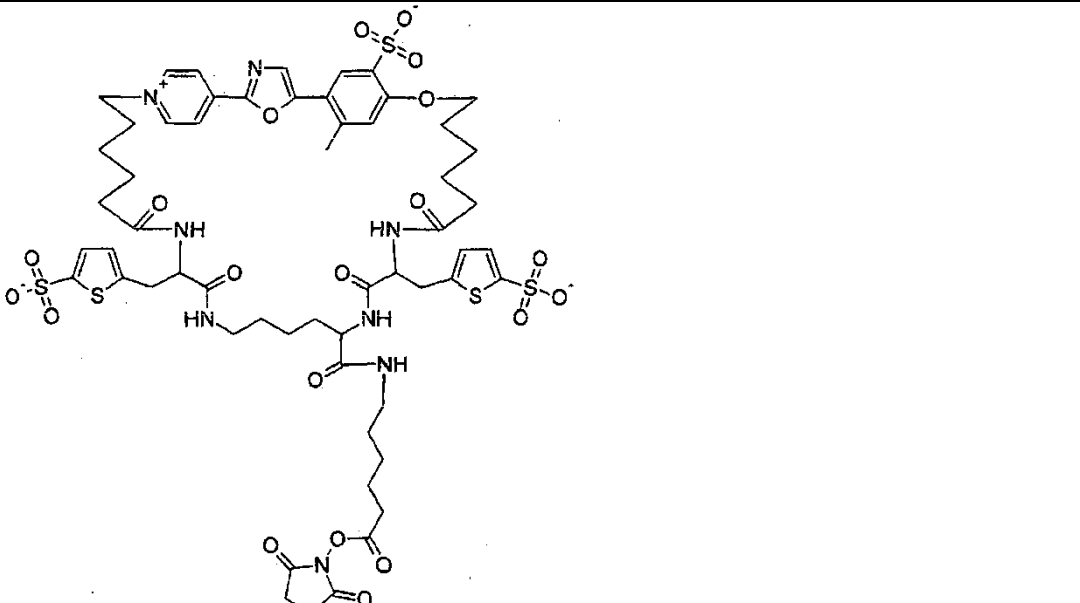
Para la síntesis de las carbocianinas, se hace reaccionar una aril-hidrazina adecuadamente sustituida, que típicamente es una fenilhidrazina adecuadamente sustituida, con una metilcetona adecuadamente sustituida para dar un derivado de 3,3-disustituido-2-metilindol. Es particularmente adecuado usar un derivado de fenilhidrazina o un derivado de naftilhidrazina sulfonada para aumentar la solubilidad del colorante final. El 3,3-disustituido-2-metilindol, después se cuaterniza en el átomo de nitrógeno a un derivado de indolio con un agente alquilante que típicamente es un haluro de alquilo tal como yoduro de etilo, un alquilsulfonato tal como p-toluenosulfonato de metilo o un sulfonato cíclico tal como propanosulfona o butanosulfona. Típicamente, el indolio o benzoindolio intermedios clave se sulfonan una o más veces antes o después de cuaternización y posterior condensación con el resto de benzazolío y resto de polimetino para formar los colorantes presentes. Se conocen bien variaciones de estos métodos en la técnica que dan sustituyentes en el puente de polimetino o en la parte de indolio o benzolío del precursor de colorante.

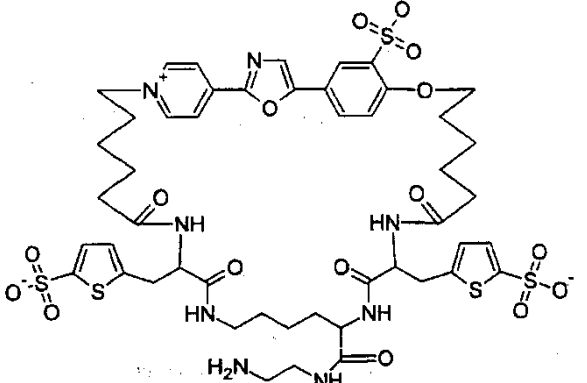
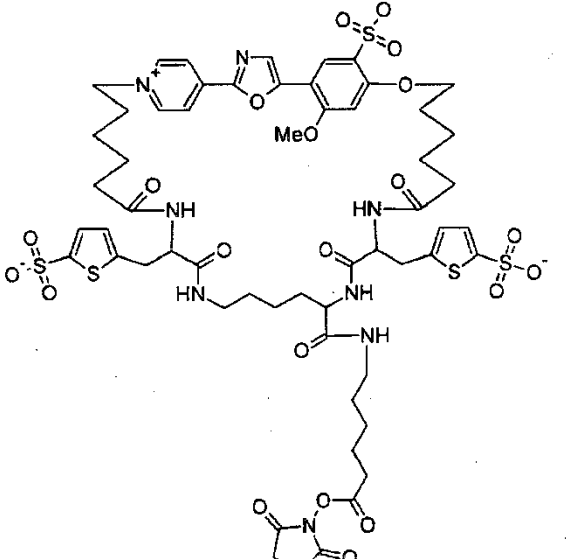
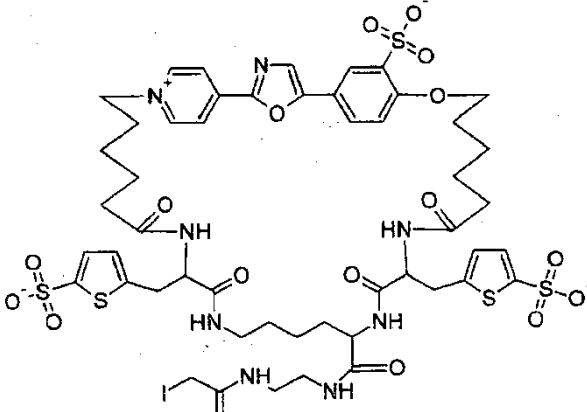
Los colorantes de azacarbocianina de la presente invención se pueden sintetizar de forma análoga, p. ej., Leung W, et al., WO 02/26891; Brooker, et al., J. AM. CHEM. SOC., 64, 199 (1942); Chu-Moyer, et al. J. ORG. CHEM., 60, 5721 (1995); Turner, J. ORG. CHEM., 48, 3401 (1983); Khanna, et al. J. ORG. CHEM., 60, 960 (1995); patente británica n° 870.753 de Ficken, et al. (1961). En general, la síntesis de estos colorantes requiere tres precursores: la sal de benzazolío o azabenzazolío adecuada, y una fuente para el espaciador de polimetino. Típicamente cada componente se selecciona para así incorporar los sustituyentes químicos o grupos funcionales adecuados (p. ej. RM) que se pueden convertir en los sustituyentes adecuados. La química que se requiere para preparar y combinar estos precursores para así dar cualquiera de los presentes derivados, la entiende bien en general el experto en la técnica.

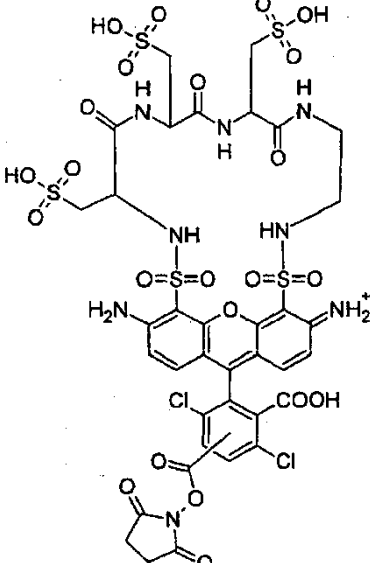
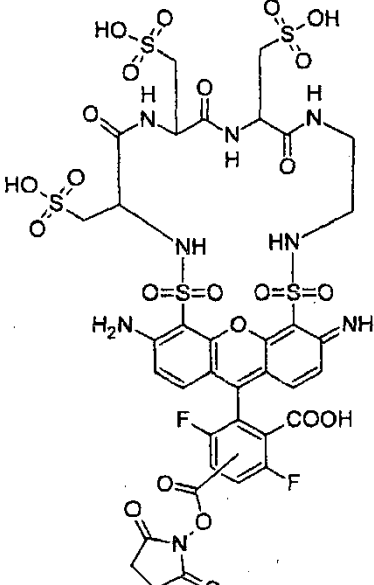
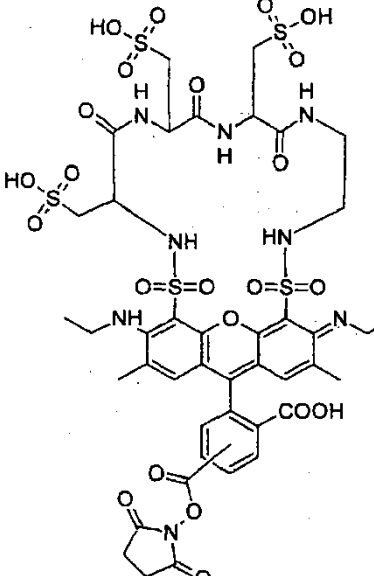
Los colorantes de xanteno se preparan a partir de derivados de resorcinol (para dar fluoresceínas), 3-aminofenoles (para dar rodaminas) o las combinaciones de resorcinol y 3-aminofenoles (para dar rodolios), p. ej., patente de EE.UU. n° 7.704.284 de Eliu, et al. (2010); patente de EE.UU. n° 7.491.830 de Lam, et al. (2009); patente de EE.UU. n° 7.344.701 de Reddington, et al. (2008); patente de EE.UU. n° 6.229.055 de Klaubert, et al. (2001); patente de EE.UU. n° 6.130.101 de Mao et al. (2000); Venkataraman, "THE CHEMISTRY OF SYNTHETIC DYES", Volume 2, 1952.

Los colorantes de oxazol se sintetizan típicamente por condensación de derivados de ácidos (p. ej., cloruros de acilo, anhídridos o ésteres activados) con 2-aminocetonas seguido de deshidratación para dar los colorantes de oxazol deseados, p. ej., Kauffman et al., J. Heterocyclic Chem. 1992, 29, 1245; Litak y Kauffman, J. Heterocyclic Chem. 1994, 31, 457; Diwu et al., Photochem. Photobiol. 1997, 66, 424; solicitud de patente de EE.UU. n° 2007007754 de Buller et al. También se conocen en la bibliografía otros métodos sintéticos alternativos para

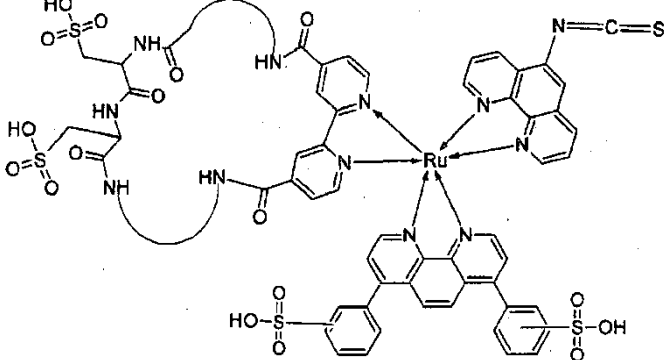
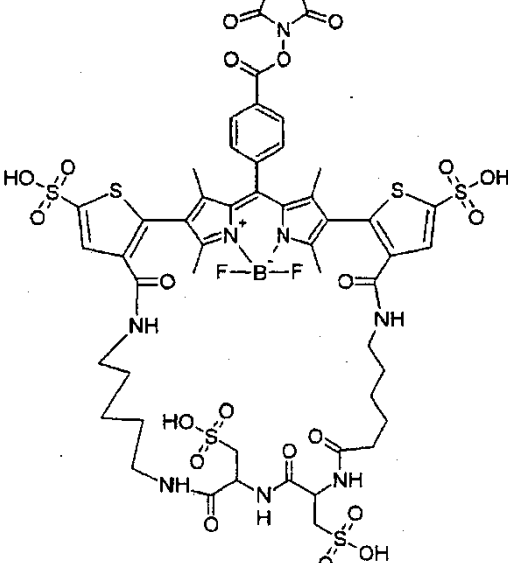
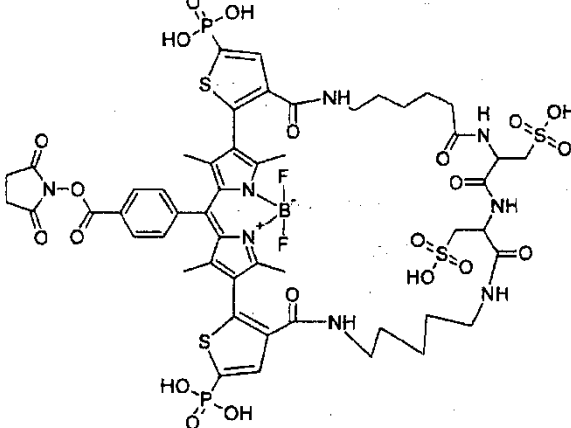
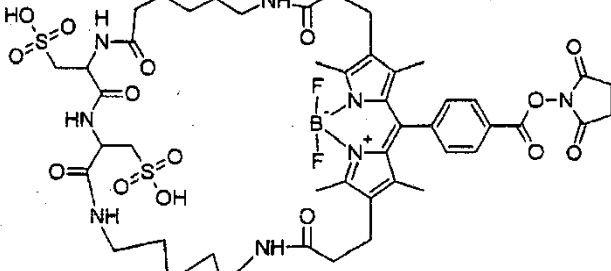
Colorante	Estructura
101 *	 <p>The structure of dye 101 features a central azo group (-N=N-) connecting two benzene rings. The left benzene ring is substituted with a sulfonate group (-O₃S) and a quaternary nitrogen atom (N⁺) which is part of a long, branched side chain. The right benzene ring is substituted with a sulfonic acid group (-SO₃H) and a tertiary nitrogen atom (N) which is also part of a long, branched side chain. Both side chains contain amide and sulfonamide groups. The side chain on the right nitrogen is further substituted with a hydroxyl group (-OH) and a sulfonic acid group (-SO₃H).</p>
102 *	 <p>The structure of dye 102 is very similar to dye 101, but the side chain attached to the right nitrogen atom is substituted with a hydrazide group (-NH-NH₂) instead of a hydroxyl group. The rest of the molecule, including the azo bridge, the sulfonate and sulfonic acid groups, and the other side chain, remains identical to dye 101.</p>
103 *	 <p>The structure of dye 103 is similar to dye 101, but the side chain attached to the left nitrogen atom is substituted with a 2,4-dichloro-6-aminopyrimidin-5-ylamino group (-NH-C₅H₃N₂Cl₂). The rest of the molecule, including the azo bridge, the sulfonate and sulfonic acid groups, and the other side chain, remains identical to dye 101.</p>

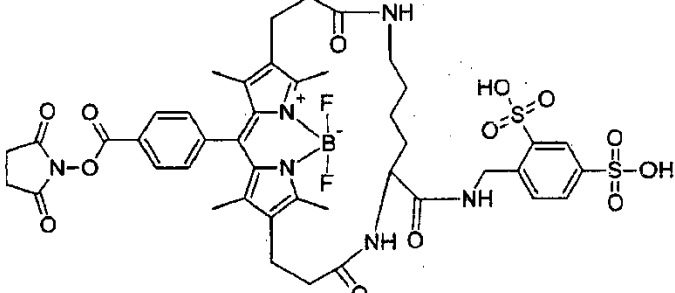
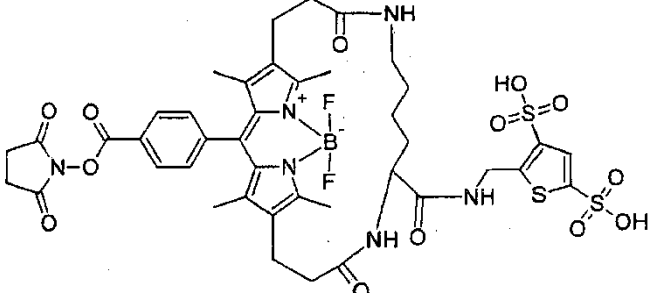
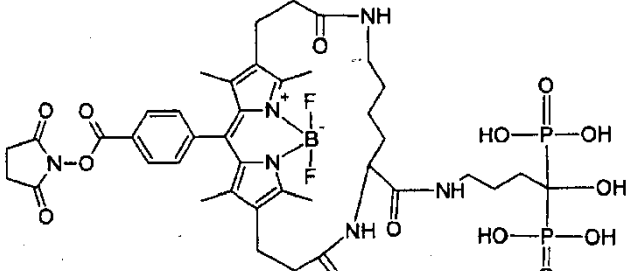
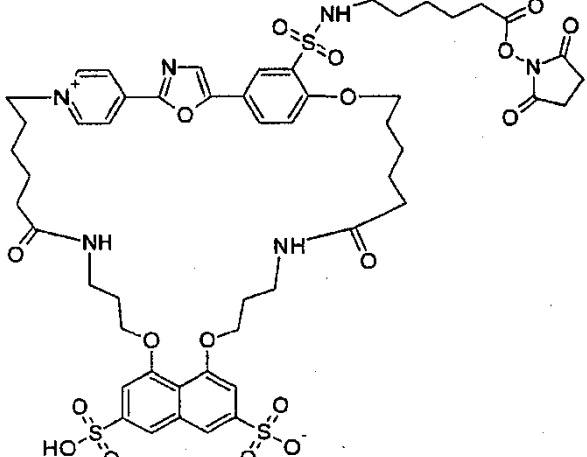
Colorante	Estructura
104 *	 <p>The structure of dye 104 is a complex polycyclic molecule. It features a central chromophore consisting of two benzimidazole rings connected by a conjugated chain. Each benzimidazole ring is substituted with a long alkyl chain ending in a succinimide ring, a phosphonic acid group (-P(=O)(OH)2), and a long alkyl chain ending in an amide group (-NH-). The amide groups are further substituted with a long alkyl chain ending in a sulfonic acid group (-SO3H).</p>
105 *	 <p>The structure of dye 105 is similar to dye 104, but the benzimidazole rings are substituted with a long alkyl chain ending in a sulfonic acid group (-SO3H) and a long alkyl chain ending in a tetrafluorophenyl group (-C6H2F4).</p>
106 *	 <p>The structure of dye 106 is a complex polycyclic molecule. It features a central chromophore consisting of a benzimidazole ring connected to a benzothiazole ring, which is further connected to a benzene ring. The benzimidazole ring is substituted with a long alkyl chain ending in a succinimide ring and a long alkyl chain ending in an amide group (-NH-). The benzothiazole ring is substituted with a long alkyl chain ending in a sulfonic acid group (-SO3-). The benzene ring is substituted with a long alkyl chain ending in a sulfonic acid group (-SO3-). The amide groups are further substituted with a long alkyl chain ending in a sulfonic acid group (-SO3-).</p>

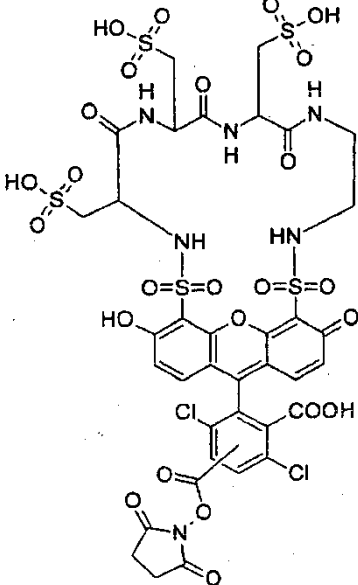
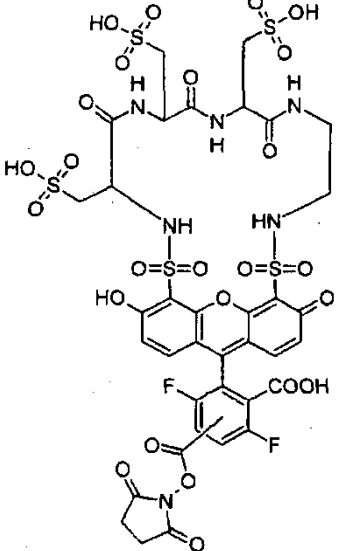
Colorante	Estructura
107	 <p>Chemical structure of dye 107. It features a central macrocyclic ring system with a sulfonate group (-SO₃⁻) and a methoxy group (-OCH₃) on the benzene ring. The macrocycle is linked to two thienothiopyran units, each substituted with a sulfonate group. The central part of the molecule consists of a chain of amide bonds connecting a primary amine group (-NH₂) to a secondary amine group (-NH-).</p>
108 *	 <p>Chemical structure of dye 108. It features a central macrocyclic ring system with a sulfonate group (-SO₃⁻) and a methoxy group (-OCH₃) on the benzene ring. The macrocycle is linked to two thienothiopyran units, each substituted with a sulfonate group. The central part of the molecule consists of a chain of amide bonds connecting a primary amine group (-NH₂) to a secondary amine group (-NH-), which is further linked to a cyclic amide structure.</p>
109	 <p>Chemical structure of dye 109. It features a central macrocyclic ring system with a sulfonate group (-SO₃⁻) and a methoxy group (-OCH₃) on the benzene ring. The macrocycle is linked to two thienothiopyran units, each substituted with a sulfonate group. The central part of the molecule consists of a chain of amide bonds connecting a primary amine group (-NH₂) to a secondary amine group (-NH-), which is further linked to a cyclic amide structure.</p>

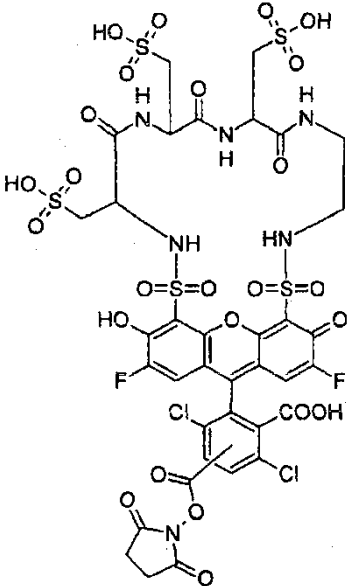
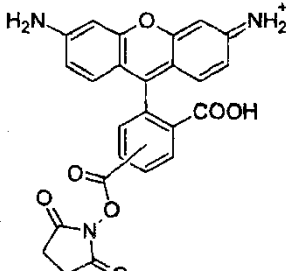
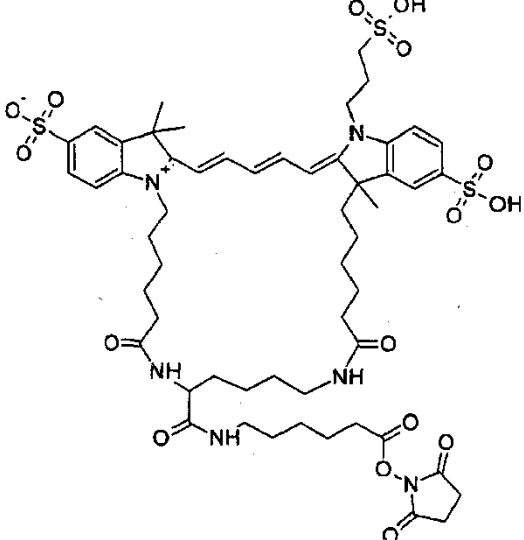
Colorante	Estructura
110*	
111*	
112*	

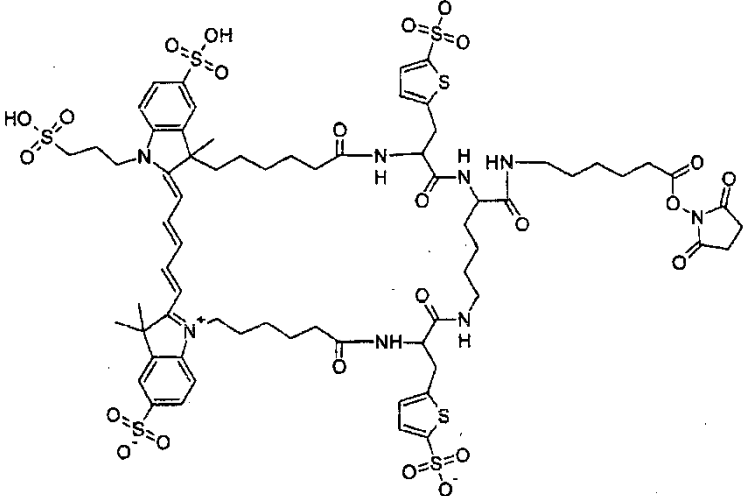
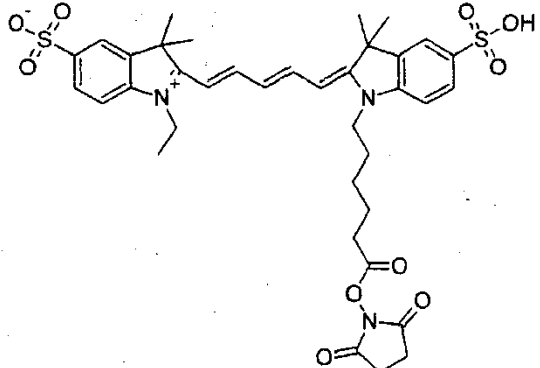
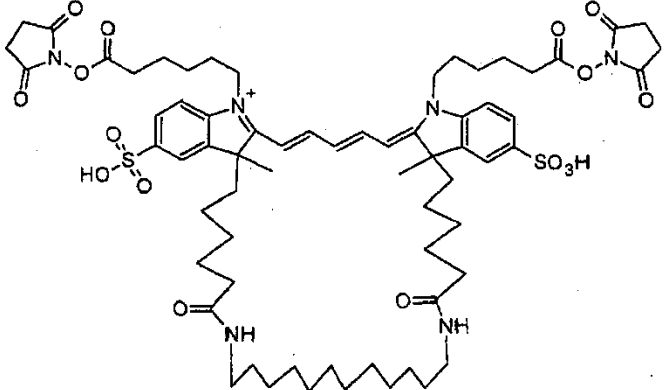
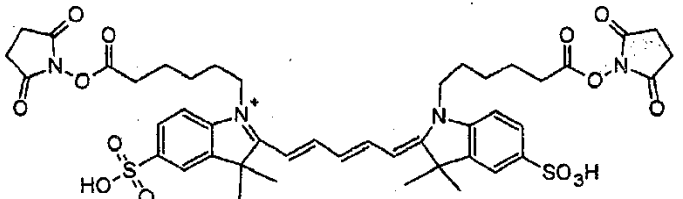
Colorante	Estructura
116 *	
117 *	
118 *	
119 *	
120 *	

Colorante	Estructura
121 *	
122 *	
123 *	
124 *	

Colorante	Estructura
125 *	
126 *	
127 *	
128 *	

Colorante	Estructura
129 *	 <p>The chemical structure of dye 129 features a central xanthene core. It is substituted with a hydroxyl group (HO) and a sulfonamide group (-NH-SO₂-) at the 2-position, and a carbonyl group (=O) at the 3-position. At the 4-position, there is a 2,4-dichloro-5-(2-oxo-2-oxo-1,3-dihydroisindol-5-yl)phenyl group. The 5-position is substituted with a sulfonamide group (-NH-SO₂-) and a carboxylic acid group (-COOH). The 6-position is substituted with a sulfonamide group (-NH-SO₂-) and a sulfonamide group (-NH-SO₂-). The 7-position is substituted with a sulfonamide group (-NH-SO₂-) and a sulfonamide group (-NH-SO₂-).</p>
130 *	 <p>The chemical structure of dye 130 is very similar to dye 129, but with a different substituent at the 4-position. Instead of a 2,4-dichloro-5-(2-oxo-2-oxo-1,3-dihydroisindol-5-yl)phenyl group, it has a 2,4-difluoro-5-(2-oxo-2-oxo-1,3-dihydroisindol-5-yl)phenyl group. The rest of the structure, including the xanthene core and the sulfonamide and carboxylic acid groups, is identical to dye 129.</p>

Colorante	Estructura
131 *	 <p>The structure of dye 131 features a central benzoxazine core. It is substituted with two hydroxyl groups, two fluorine atoms, a chlorine atom, and a carboxylic acid group. The core is linked via amide bonds to two side chains, each containing a sulfonic acid group and a secondary amine. A succinimide ring is attached to the central core.</p>
132 *	 <p>The structure of dye 132 consists of a benzoxazine core with two primary amine groups at the 4 and 8 positions. It is substituted with a carboxylic acid group and a succinimide ring.</p>
133 *	 <p>The structure of dye 133 is a complex polycationic dye. It features a central polyene chain connecting two indole-like rings. Each ring is substituted with a sulfonic acid group and a tertiary amine. The structure includes multiple amide linkages and a succinimide ring.</p>

Colorante	Estructura
134 *	
135 *	
136 *	
137 *	

* colorante que no está dentro de las reivindicaciones

Aplicaciones y métodos de uso

En un aspecto de la invención, los compuestos colorantes de la invención se usan para teñir o marcar directamente una muestra de modo que la muestra pueda ser identificada o cuantificada. Por ejemplo, dichos colorantes se pueden añadir como parte de un ensayo para un analito diana biológico, como un elemento trazador detectable en un fluido biológico o no biológico; o para fines como terapia fotodinámica de tumores, en los que una muestra teñida se irradia para destruir selectivamente células y tejidos tumorales; o para la fotoextirpación de placa o células arteriales, normalmente por la producción fotosensibilizada de oxígeno singlete. En una realización preferida, el

conjugado de colorante se usa para teñir una muestra que comprende un ligando para el que la sustancia conjugada es un miembro complementario de una pareja de unión específica (p. ej., tabla 3). Típicamente, la muestra se obtiene directamente de una fuente líquida o como un lavado de un material sólido (orgánico o inorgánico) o un medio de crecimiento en el que se han introducido las células para el cultivo, o una solución tampón en la que se han puesto las células para la evaluación. Cuando la muestra comprende células, las células son opcionalmente células individuales, incluyendo microorganismos, o múltiples células asociadas con otras células en capas bi o tridimensionales, incluyendo organismos multicelulares, embriones, tejidos, biopsias, filamentos, biopelículas, etc.

Alternativamente, la muestra es un sólido, opcionalmente un frotis o raspado o un retenido separado de un líquido o vapor por filtración. En un aspecto de la invención, la muestra se obtiene de un fluido biológico, que incluye fluidos biológicos separados o no filtrados tales como la orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, fluidos linfáticos, homogeneizado de tejido, fluido intersticial, extractos celulares, moco, saliva, esputo, heces, secreciones fisiológicas u otros fluidos similares.

Alternativamente, la muestra se obtiene de una muestra ambiental tal como suelo, agua o aire; o de una fuente industrial tal como tomada de un flujo de residuos, una fuente de agua, una línea de suministro o un lote de producción.

Tabla 3. Parejas de unión específicas representativas

Antígeno	Anticuerpo
Biotina	Anti-biotina o avidina o estreptavidina o neutravidina
IgG*	Proteína A o proteína G o anticuerpo anti-IgG
Fármaco	Receptor de fármaco
Toxina	Receptor de toxina
Hidrato de carbono	Receptor de lectina o hidrato de carbono
Péptido	Receptor de péptido
Nucleótido	Nucleótido complementario
Proteína	Receptor de proteína
Sustrato de enzima	Enzima
ADN (ARN)	aADN (aARN)**
Hormona	Receptor hormonal
Psoraleno	Ácido nucleico
Molécula diana	aptámero de ADN o ARN
Ion	Agente quelante de iones

* IgG es una inmunoglobulina; ** aADN y aARN son cadenas de sentido contrario (complementarias) usadas para la hibridación

En otra realización más, la muestra está presente sobre o en una matriz sólida o semisólida. En un aspecto de la invención, la matriz es una membrana. En otro aspecto, la matriz es un gel electroforético, tal como se usa para separar y caracterizar ácidos nucleicos o proteínas, o es una transferencia preparada por transferencia de un gel electroforético a una membrana. En otro aspecto, la matriz es un chip de silicio o un portaobjetos de vidrio, y el analito de interés se ha inmovilizado sobre el chip o portaobjetos en una matriz (p. ej., la muestra comprende proteínas o polímeros de ácidos nucleicos en una micromatriz). En otro aspecto más, la matriz es una placa de micropocillos o chip microfluidado, y la muestra se analiza por métodos automáticos, típicamente por diferentes métodos de cribado de alta capacidad, tales como cribado de fármacos.

Los compuestos colorantes de la invención se usan en general combinando un compuesto colorante de la invención como se ha descrito antes con la muestra de interés en condiciones seleccionadas para dar una respuesta óptica detectable. La expresión "compuesto colorante" se usa en la presente memoria para referirse a todos los aspectos de los colorantes reivindicados, incluyendo tanto colorantes reactivos como conjugados reactivos. El compuesto colorante típicamente forma una asociación o complejo covalente o no covalente con un elemento de la muestra, o está simplemente presente dentro de los límites de la muestra o parte de la muestra. Después la muestra se ilumina a una longitud de onda seleccionada para producir la respuesta óptica. Típicamente, la tinción de la muestra se usa para determinar una característica específica de la muestra comparando además la respuesta óptica con una respuesta de referencia o esperada.

Una respuesta óptica detectable significa un cambio en, o aparición de una señal óptica que es detectable por observación o mediante instrumentos. Típicamente, la respuesta detectable es un cambio en la fluorescencia, tal como un cambio en la intensidad, distribución de la longitud de onda excitación o emisión de fluorescencia, duración de fluorescencia, polarización de fluorescencia, o una combinación de los mismos. El grado y/o localización de la tinción, comparado con una respuesta de referencia o esperada, indica si la muestra tiene y en qué grado una característica dada. Algunos colorantes de la invención pueden presentar poca emisión de fluorescencia, pero todavía son útiles como colorantes cromógenos. Dichos cromóforos son útiles como aceptores de energía en aplicaciones FRET, o simplemente para impartir el color deseado a una muestra o porción de muestra.

5 Para aplicaciones biológicas, los compuestos colorantes de la invención se usan típicamente en una solución acuosa, principalmente acuosa o miscible con agua preparada de acuerdo con métodos conocidos en general en la técnica. La concentración exacta del compuesto colorante depende de las condiciones experimentales y los resultados deseados, pero típicamente está en el intervalo de aproximadamente uno nanomolar a uno milimolar o mayor. La concentración óptima se determina por variación sistemática hasta que se logran resultados satisfactorios con fluorescencia de fondo mínima.

10 Los compuestos colorantes se usan lo más ventajosamente para teñir muestras con componentes biológicos. La muestra puede comprender mezclas heterogéneas de componentes (incluyendo células intactas, extractos de células, bacterias, virus, orgánulos y mezclas de los mismos), o un solo componente o grupo homogéneo de componentes (p. ej., aminoácidos naturales o sintéticos, ácidos nucleicos o polímeros de hidratos de carbono o complejos de membrana lipídica). Estos colorantes en general no son tóxicos para las células vivas y otros componentes biológicos, dentro de las concentraciones de uso.

15 El compuesto colorante se combina con la muestra en cualquier forma que facilite el contacto entre el compuesto colorante y los componentes de la muestra de interés. Típicamente, el compuesto colorante o una solución que contiene el compuesto colorante se añade simplemente a la muestra. Algunos colorantes de la invención, en particular los que están sustituidos con uno o más restos de ácido sulfónico, tienden a ser impermeables a membranas de células biológicas, y una vez dentro de células viables típicamente son retenidos. Se pueden usar tratamientos que permeabilizan la membrana plasmática, tales como electroporación, tratamientos de choque o ATP extracelular alto, que se pueden usar para introducir compuestos colorantes seleccionados en las células.
20 Alternativamente, se pueden insertar compuestos colorantes seleccionados en las células, p. ej., por microinyección por presión, carga de raspado, métodos de pinzamiento zonal de membrana o fagocitosis.

Los colorantes que incorporan un resto amina o hidrazina alifática se pueden microinyectar en células, donde se pueden fijar en el sitio por fijadores aldehídos tales como formaldehído o glutaraldehído. Esta fijabilidad hace que dichos colorantes sean útiles para aplicaciones intracelulares tales como trazador neuronal.

25 Los compuestos colorantes que tienen un sustituyente lipófilo, tales como fosfolípidos, no se incorporarán de forma covalente en los ensamblajes lipídicos, p. ej., para usar como sondas para la estructura de membrana; o para la incorporación en liposomas, lipoproteínas, películas, plásticos, microesferas lipófilas o materiales similares; o para trazar. Los colorantes lipófilos son útiles como sondas fluorescentes de estructura de membrana.

30 Los compuestos colorantes químicamente reactivos se unirán covalentemente a un grupo funcional correspondiente en una amplia variedad de materiales, formando conjugados de colorantes como se ha descrito antes.

El uso de compuestos colorantes para marcar sitios reactivos sobre la superficie de las células, en membranas celulares o en compartimientos intracelulares tales como orgánulos, o en el citoplasma de la célula, permite la determinación de su presencia o cantidad, accesibilidad o su distribución espacial y temporal en la muestra. Los colorantes fotorreactivos se pueden usar de forma similar para fotomarcas componentes de la membrana externa de células biológicas o como trazadores polares fotofijables para las células.
35

Opcionalmente, la muestra se lava después de la tinción para eliminar compuesto colorante residual, exceso o no unido. La muestra se combina opcionalmente con una o más soluciones en el curso de la tinción, incluyendo soluciones de lavado, permeabilización y/o soluciones de fijación y soluciones que contienen reactivos de detección adicionales. Un reactivo de detección adicional típicamente produce una respuesta detectable debido a la presencia de un componente de la célula específico, sustancia intracelular o condición celular, de acuerdo con métodos conocidos en general en la técnica. Cuando el reactivo de detección adicional tiene o da un producto con propiedades espectrales que difieren de la de los compuestos colorantes presentes, son posibles aplicaciones de multicolores. Esto es particularmente útil cuando el reactivo de detección adicional es un colorante o conjugado con colorante de la presente invención que tiene propiedades espectrales que son detectablemente distintas de las del colorante de tinción.
40
45

Los conjugados de colorantes de la invención se usan de acuerdo con métodos extensamente conocidos en la técnica, p. ej., el uso de conjugados de anticuerpos en microscopía y ensayos de inmunofluorescencia; y conjugados de nucleótidos u oligonucleótidos para ensayos de hibridación de ácidos nucleicos y secuenciación de ácidos nucleicos p. ej., patente de EE.UU. n° 5.332.666 de Prober, et al. (1994); patente de EE.UU. n° 5.171.534 de Smith, et al. (1992); patente de EE.UU. n° 4.997.928 de Hobbs (1991); y solicitud WO 94/05688 de Menchen, et al.). Los conjugados de colorantes de múltiples colorantes independientes de la invención tienen utilidad para aplicaciones de múltiples colores.
50

En cualquier momento después o durante la tinción, la muestra se ilumina con una longitud de onda de luz seleccionada para dar una respuesta óptica detectable y observada con un medio para detectar la respuesta óptica.
55 El equipamiento que es útil para iluminar los compuestos colorantes de la invención incluye lámparas ultravioletas portátiles, lámparas de arco de mercurio, lámparas de xenón, láseres y diodos de láseres. Estas fuentes de iluminación están opcionalmente integradas en escáneres láser, lectores de multiplaca fluorescentes, detectores estándar o minifluorímetros o cromatográficos. Las realizaciones preferidas de la invención son colorantes que

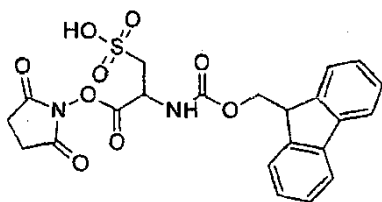
pueden ser excitados en o cerca de las longitudes de onda de 405 nm, 488 nm, 546 nm, 594 nm, 633-636 nm, 647 nm, 660 nm, 680 nm y más allá de 700 nm, ya que estas regiones se corresponden estrechamente con la salida de fuentes de excitación relativamente baratas.

- 5 La respuesta óptica se detecta opcionalmente por inspección visual, o mediante el uso de cualquiera de los siguientes dispositivos: cámaras de CCD, videocámaras, películas fotográficas, dispositivos de escaneo láser, fluorómetros, fotodiodos, contadores cuánticos, microscopios de epifluorescencia, microscopios de barrido, citómetros de flujo, lectores de microplaca de fluorescencia, o por medios para amplificar la señal tal como tubos fotomultiplicadores. Cuando la muestra se examina usando un citómetro de flujo, el examen de la muestra incluye opcionalmente separación de partes de la muestra de acuerdo con su respuesta de fluorescencia.
- 10 Un aspecto de la presente invención es la formulación de kits que facilitan la práctica de diferentes ensayos usando cualquiera de los colorantes de la invención, como se ha descrito antes. Los kits de la invención típicamente comprenden un colorante coloreado o luminiscente de la invención, sea presente como un marcador reactivo químico útil para preparar conjugados de colorantes, o presente como un conjugado de colorante donde la sustancia conjugada es un miembro de una pareja de unión específica, o un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un polímero de ácido nucleico, un péptido o una proteína. Los kits comprenden además opcionalmente uno o más agentes de tamponamiento, típicamente presentes como una solución acuosa. Los kits de la invención comprenden además opcionalmente reactivos de detección adicionales, un medio de purificación para purificar la sustancia marcada resultante, patrones de luminiscencia, enzimas, inhibidores de enzimas, disolventes orgánicos o instrucciones para llevar a cabo un ensayo de la invención.

20 EJEMPLOS

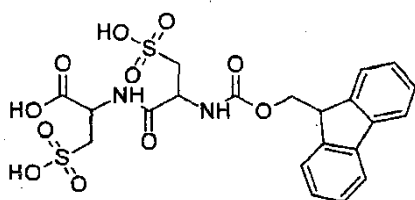
Los ejemplos de estrategias sintéticas, conjugados y método de uso para colorantes seleccionados de la invención se proporcionan en los siguientes ejemplos. Los ejemplos a continuación se dan solo para ilustrar la práctica de esta invención.

Ejemplo 1. Preparación del compuesto 1 (no está dentro de las reivindicaciones)



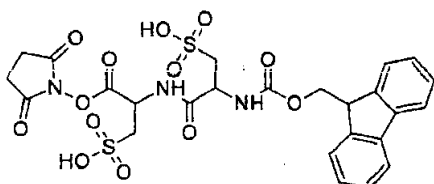
- 25 A una solución de la sal de trietilamina de Fmoc-ácido cisteico (6 g en 25 ml DMSO) se añade tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (4 g), seguido de la adición de trietilamina (1,4 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La solución se vierte en EtOAc (250 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (5 x 50 ml), éter (3 x 50 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto 1.

- 30 Ejemplo 2. Preparación del compuesto 2 (no está dentro de las reivindicaciones)



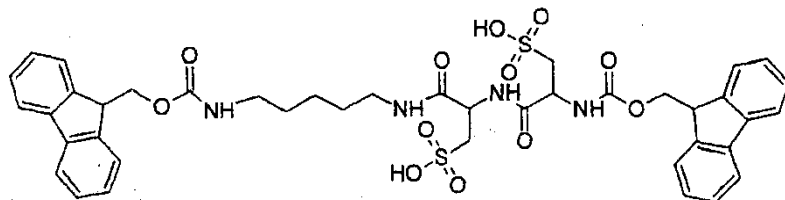
- 35 A una solución del compuesto 1 (6 g en 15 ml DMSO) se añade sal de trietilamina del ácido cisteico (3 g en 10 ml DMSO) a temperatura ambiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 h. La solución se vierte en EtOAc (250 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (5 x 50 ml), éter (3 x 50 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto bruto 2. El sólido bruto se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 2 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

Ejemplo 3. Preparación del compuesto 3 (no está dentro de las reivindicaciones)



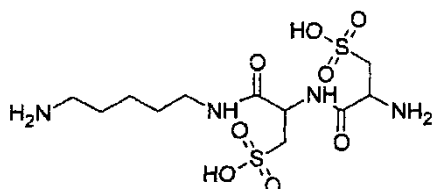
El compuesto 3 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 2 con tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio de acuerdo con el procedimiento del compuesto 1.

Ejemplo 4. Preparación del compuesto 4 (no está dentro de las reivindicaciones)



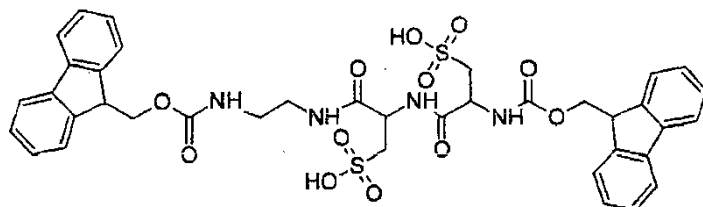
- 5 A una solución del compuesto 3 (3 g en 15 ml DMF) se añade sal de HCl de Fmoc-cadaverina (5 g en 15 ml DMF) a temperatura ambiente, seguido de la adición de trietilamina (1,5 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 h. La solución se vierte en EtOAc (250 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (5 x 50 ml), éter (3 x 50 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto bruto 4. El sólido bruto se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

10 Ejemplo 5. Preparación del compuesto 5 (no está dentro de las reivindicaciones)



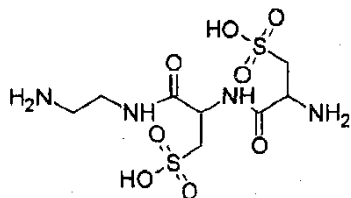
- 15 A una solución del compuesto 4 (1 g en 15 ml DMF) se añade piperidina (1,2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 h. La solución se vierte en EtOAc (250 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (5 x 50 ml), éter (3 x 50 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto bruto 5. El sólido bruto se disuelve en HCl al 5%, y se purifica más en una columna Sephadex LH-20 para dar el producto puro usando HCl al 0,1% como el sistema de elución.

Ejemplo 6. Preparación del compuesto 6 (no está dentro de las reivindicaciones)



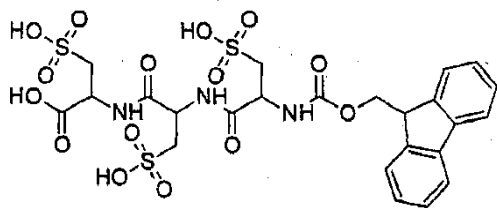
- 20 El compuesto 6 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 3 con Fmoc-etilendiamina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 4.

Ejemplo 7. Preparación del compuesto 7 (no está dentro de las reivindicaciones)



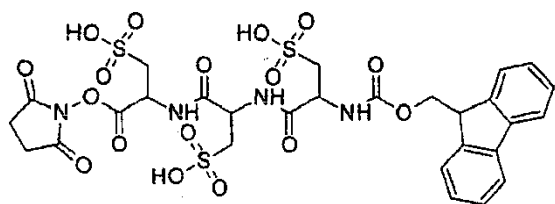
El compuesto 7 se prepara de forma análoga a partir de la desprotección del compuesto 6 con piperidina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 5.

25 Ejemplo 8. Preparación del compuesto 8 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 8 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 3 con ácido cisteico de acuerdo con el procedimiento del compuesto 2.

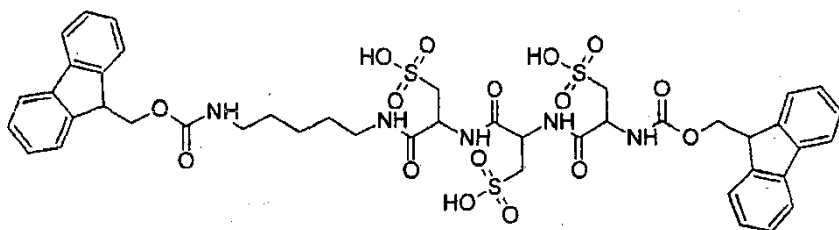
Ejemplo 9. Preparación del compuesto 9 (no está dentro de las reivindicaciones)



5

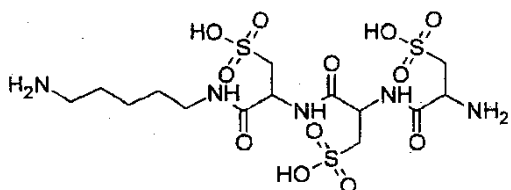
El compuesto 9 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 8 con tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio de acuerdo con el procedimiento del compuesto 1.

Ejemplo 10. Preparación del compuesto 10 (no está dentro de las reivindicaciones)



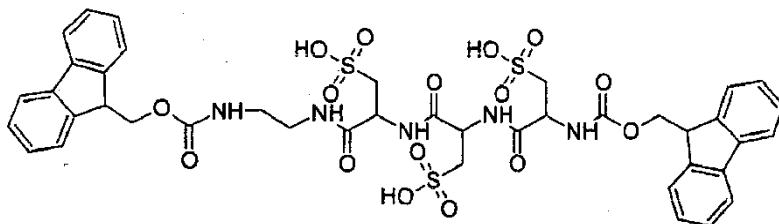
10 El compuesto 10 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 9 con Fmoc-cadaverina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 4.

Ejemplo 11. Preparación del compuesto 11 (no está dentro de las reivindicaciones)



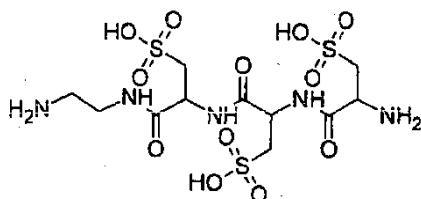
15 El compuesto 11 se prepara de forma análoga a partir de la desprotección del compuesto 10 con piperidina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 5.

Ejemplo 12. Preparación del compuesto 12 (no está dentro de las reivindicaciones)



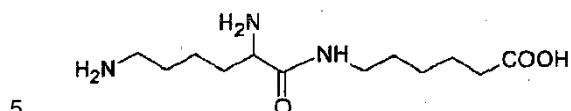
El compuesto 12 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 9 con Fmoc-etilendiamina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 4.

20 Ejemplo 13. Preparación del compuesto 13 (no está dentro de las reivindicaciones)



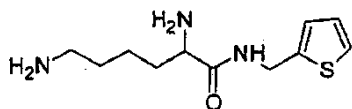
El compuesto 13 se prepara de forma análoga a partir de la desprotección del compuesto 9 con piperidina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 5.

Ejemplo 14. Preparación del compuesto 14 (no está dentro de las reivindicaciones)



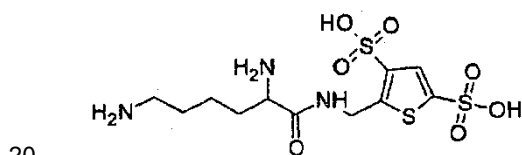
La mezcla de Boc-Lys(Boc)-OH (10 g), N-hidroxisuccinimida (4 g) y DCC (7 g) en DMF (100 ml) se agita a temperatura ambiente durante la noche. Después de separar el sólido (DCU), el filtrado [Boc-Lys(Boc)-OSu] se añade a una solución de ácido 6-aminocaproico (4 g) en agua (50 ml), seguido de la adición de Na₂CO₃ 5 M para ajustar el pH a 8-9. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. Después de diluir con agua (500 ml), la mezcla se acidifica con HCl acuoso al 5% a pH 3 y se extrae con acetato de etilo (5 x 250 ml). Los extractos combinados se lavan con salmuera y se secan sobre Na₂SO₄. Después de separar el disolvente, el residuo [Boc-Lys(Boc)-NH(CH₂)₅COOH] se disuelve en 1,4-dioxano (1000 ml), seguido de la adición de HCl 4 M en dioxano (1000 ml). La mezcla se agita durante 6 horas. El disolvente se decanta y el sólido se lava con acetato de etilo (5 x 250 ml) y éter (3 x 200 ml). La sal de HCl del compuesto 14 se seca a vacío.

15 Ejemplo 15. Preparación del compuesto 15 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 15 se prepara de forma análoga a partir de la reacción de Boc-Lys(Boc)-OH con 2-aminometil-tiofeno de acuerdo con el procedimiento del compuesto 14.

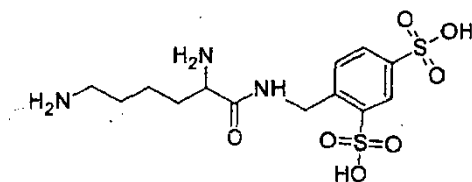
Ejemplo 16. Preparación del compuesto 16 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 15 (1 g) se suspende en H₂SO₄ concentrado (5 ml). A la suspensión se añade H₂SO₄ fumante al 20% (5 ml). La mezcla de reacción se agita a 0 °C hasta que la reacción se ha completado como indica el análisis de TLC. La mezcla de reacción se añade gota a gota a éter frío (200 ml) con agitación vigorosa para dar el compuesto bruto 16. El material bruto se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 16 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

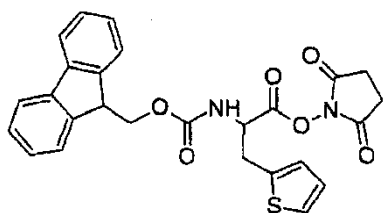
25

Ejemplo 17. Preparación del compuesto 17 (no está dentro de las reivindicaciones)



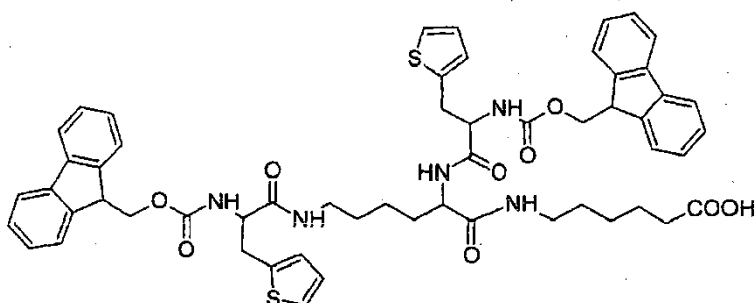
El compuesto 17 se prepara de forma análoga a partir de la reacción de Boc-Lys(Boc)-OH con 2',4'-disulfobencilamina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 14.

30 Ejemplo 18. Preparación del compuesto 18 (no está dentro de las reivindicaciones)



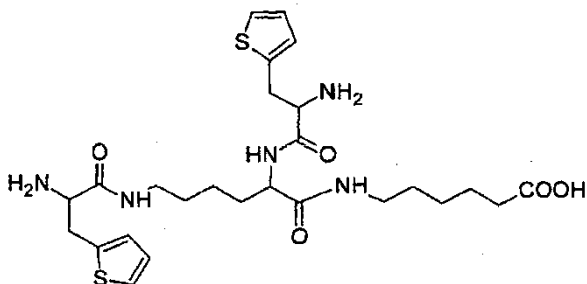
- 5 La mezcla de beta-(2-tienil)-Fmoc-L-alanina (10 g), N-hidroxisuccinimida (10 g) y DCC (15 g) en DMF (100 ml) se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtra para separar el sólido insoluble. Al filtrado se añade agua (250 ml), y el sólido se recoge por filtración. El sólido se lava con agua, y se seca con alto vacío. El sólido bruto se usa directamente para la siguiente etapa de reacción sin más purificación.

Ejemplo 19. Preparación del compuesto 19 (no está dentro de las reivindicaciones)



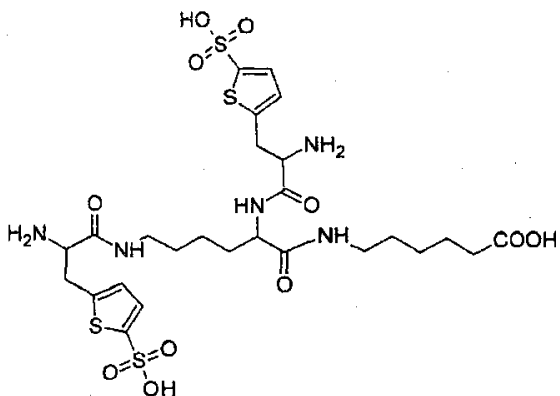
- 10 La mezcla de los compuestos 14 (5 g) y 18 (2 g) se disuelve en DMF (50 ml). A la solución se añade trietilamina (3 ml), y se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se añade gota a gota a agua (250 ml), y se filtra para recoger el precipitado. El sólido se lava con agua, y se seca con alto vacío. El material bruto se purifica más por una columna de gel de sílice para dar el compuesto puro 19 usando un gradiente de cloroformo/metanol.

Ejemplo 20. Preparación del compuesto 20 (no está dentro de las reivindicaciones)



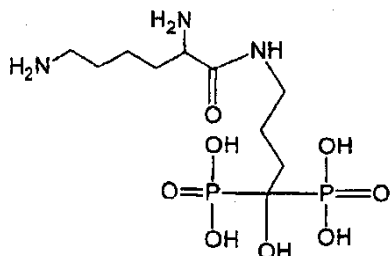
- 15 A una solución del compuesto 19 (2 g en 20 ml DMF) se añade piperidina (1,2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 h. La solución se vierte en EtOAc (150 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (5 x 50 ml), éter (3 x 50 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto 20.

Ejemplo 21. Preparación del compuesto 21 (no está dentro de las reivindicaciones)



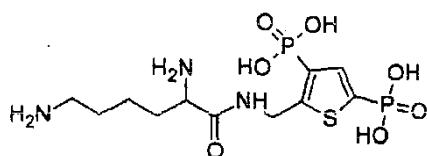
El compuesto 21 se prepara de forma análoga a partir de la sulfonación del compuesto 20 usando ácido sulfúrico fumante de acuerdo con el procedimiento del compuesto 16.

Ejemplo 22. Preparación del compuesto 22 (no está dentro de las reivindicaciones)



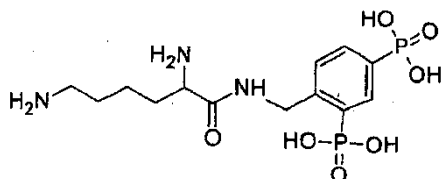
- 5 El compuesto 22 se prepara de forma análoga a partir de la reacción de Boc-Lys(Boc)-OH con la sal sódica del ácido 4-amino-1-hidroxi-1-fosfonobutil-fosónico de acuerdo con el procedimiento del compuesto 14.

Ejemplo 23. Preparación del compuesto 23 (no está dentro de las reivindicaciones)



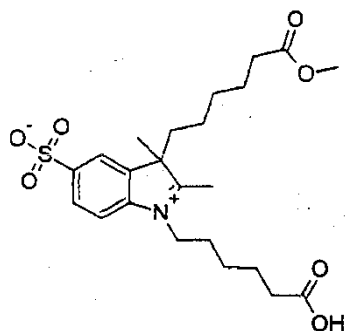
- 10 El compuesto 23 se prepara de forma análoga a partir de la reacción de Boc-Lys(Boc)-OH con 2-(2',4'-difosfoniltienil)metilamina de acuerdo con el procedimiento del compuesto 14.

Ejemplo 24. Preparación del compuesto 24 (no está dentro de las reivindicaciones)



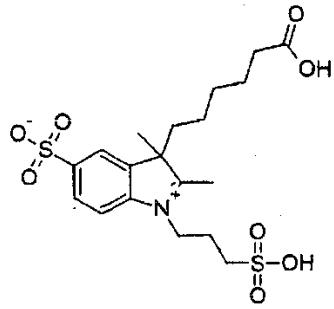
El compuesto 24 se prepara de forma análoga a partir de la reacción de Boc-Lys(Boc)-OH con 1-aminometil-2,4-difosfonilbenceno de acuerdo con el procedimiento del compuesto 14.

- 15 Ejemplo 25. Preparación del compuesto 25 (no está dentro de las reivindicaciones)



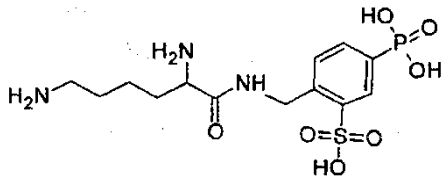
El compuesto 25 se prepara como se describe en la patente de EE.UU. nº 7.465.810 (2008).

Ejemplo 26. Preparación del compuesto 26 (no está dentro de las reivindicaciones)



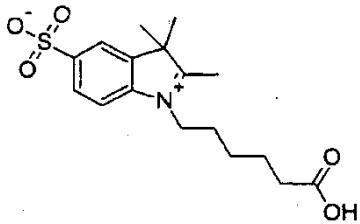
El compuesto 26 se prepara como se describe en la patente de EE.UU. nº 7.465.810 (2008).

Ejemplo 27. Preparación del compuesto 27 (no está dentro de las reivindicaciones)



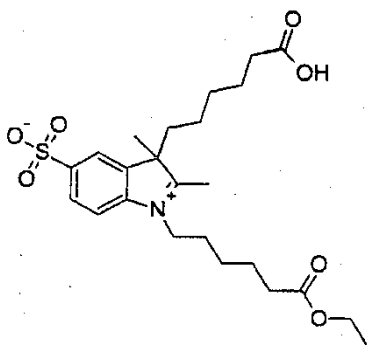
- 5 El compuesto 27 se prepara de forma análoga a partir de la reacción de Boc-Lys(Boc)-OH con 1-aminometil-2-sulfonil-4-fosfonilbenzoato de acuerdo con el procedimiento del compuesto 14.

Ejemplo 28. Preparación del compuesto 28 (no está dentro de las reivindicaciones)



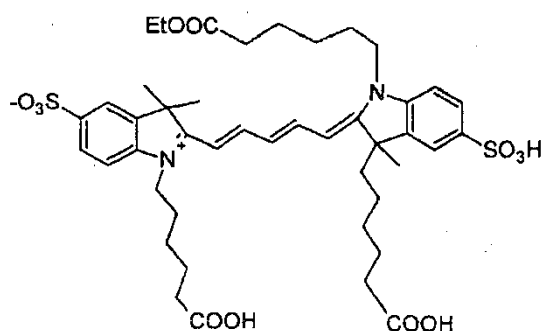
El compuesto 28 se prepara como se describe en patente de EE.UU. nº 5.627.027 (1997).

- 10 Ejemplo 29. Preparación del compuesto 29 (no está dentro de las reivindicaciones)



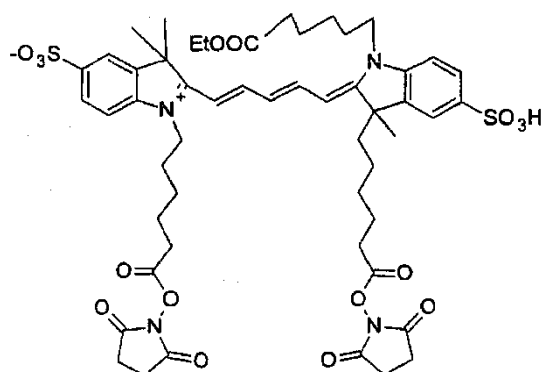
El compuesto 29 se prepara como se describe en patente de EE.UU. nº 7.465.810 (2008).

Ejemplo 30. Preparación del compuesto 30 (no está dentro de las reivindicaciones)



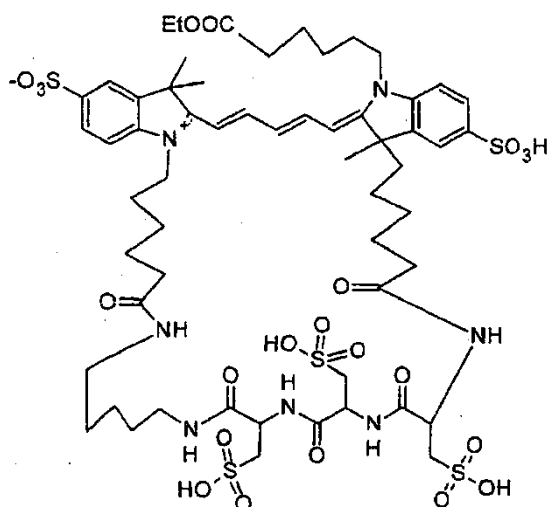
5 Una solución del compuesto 28 (1 g) y el monohidrocloreto de malonaldehído de bis(fenilimina) (0,8 g) en ácido acético (5 ml) y anhídrido acético (5 ml) se calienta a 120°C durante 2 horas. La terminación de la reacción se sigue por el espectro de absorción en metanol. La solución del intermedio de anilo se mezcla con el compuesto 29 (1,5 g), y después se añaden más anhídrido acético (5 ml) y piridina (10 ml). La mezcla de reacción se calienta durante 30 min hasta que desaparece el intermedio de anilo (seguido por el espectro de absorción). La mezcla de reacción se enfría y se vierte en acetato de etilo (50 ml). El producto bruto se recoge por centrifugación y se lava con acetato de etilo dos veces y se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 30 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

10 Ejemplo 31. Preparación del compuesto 31 (no está dentro de las reivindicaciones)



15 A una solución del compuesto 30 (300 mg) y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (300 mg) en DMF (10 ml) se añade trietilamina (0,4 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se vierte en EtOAc (150 ml). El éster de di-succinimidilo se recoge por centrifugación y se lava con EtOAc (5 x 50 ml), EtOEt (5 x 50 ml) y se seca a vacío.

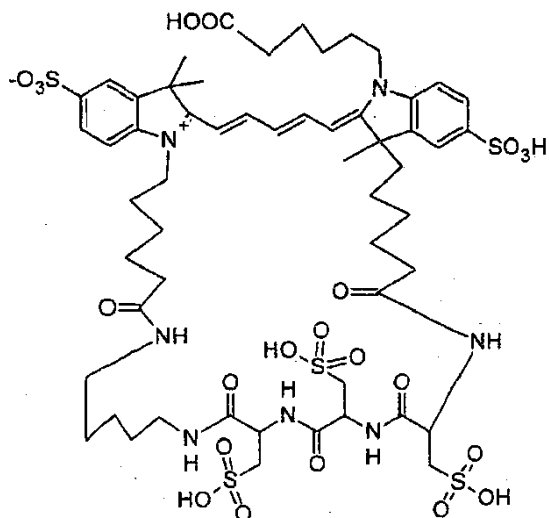
Ejemplo 32. Preparación del compuesto 32 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto bruto 31 (100 mg) se disuelve en DMF (150 ml) y se añade una solución del compuesto 11 (100 mg) en agua (25 ml) [neutralizada con Na₂CO₃ a pH 8,0] lentamente durante un periodo de 2 h. La mezcla se agita a

temperatura ambiente durante la noche. Después de separar el disolvente, el residuo se purifica por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 32 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

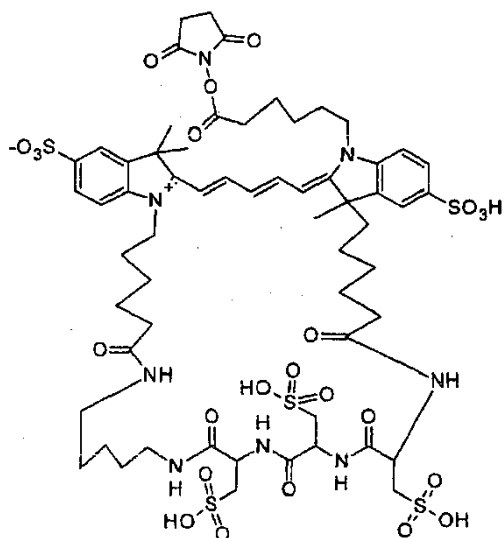
Ejemplo 33. Preparación del compuesto 33 (no está dentro de las reivindicaciones)



5

El compuesto 32 (50 mg) se disuelve en metanol (2 ml). A la solución se añade NaOH 0,1 M (0,5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3-6 horas y se neutraliza con HCl 1 M a pH 6,0. Después de separar el disolvente, el residuo se purifica por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 33 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

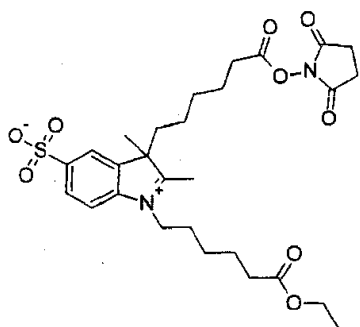
10 Ejemplo 34. Preparación del compuesto 34 (no está dentro de las reivindicaciones)



15

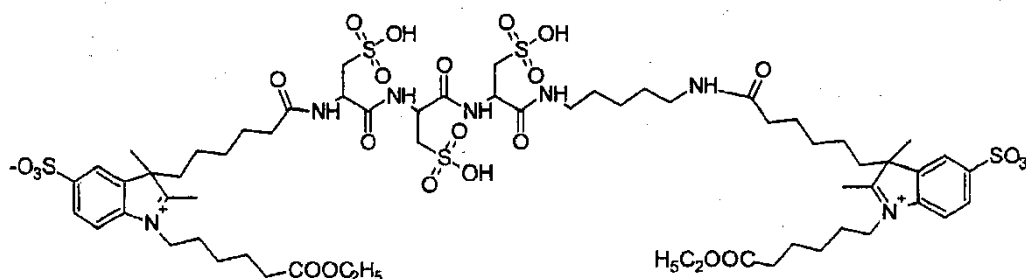
A una solución del compuesto 33 (10 mg) en DMF (0,4 ml) se añade tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (4 mg), seguido de trietilamina (0,03 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La solución se vierte en EtOAc (15 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (3 x 10 ml), éter (3 x 10 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto 34.

Ejemplo 35. Preparación del compuesto 35 (no está dentro de las reivindicaciones)



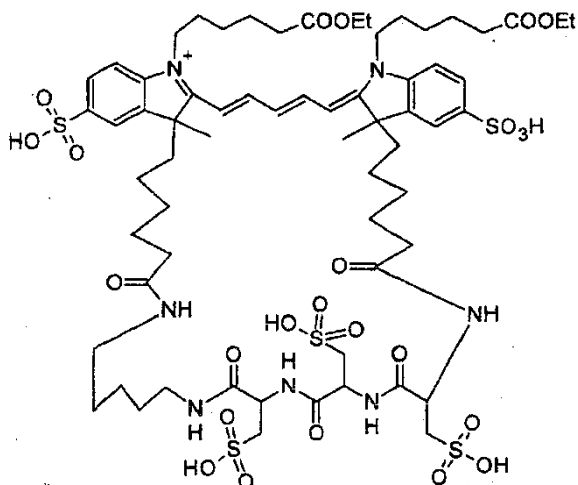
5 A la solución del éster de etilo del compuesto 29 (5 g) en DMF (20 ml) se añade carbonato de di(N-succinimidilo) (4 g), seguido de trietilamina (4 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La solución se vierte en EtOAc (150 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (5 x 100 ml), éter (3 x 100 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto 35.

Ejemplo 36. Preparación del compuesto 36 (no está dentro de las reivindicaciones)



10 La mezcla de los compuestos 11 (100 mg) y 35 (500 mg) se disuelve en DMF (50 ml). A la solución se añade trietilamina (3 ml), y se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se añade gota a gota a EtOAc (250 ml), y se filtra para recoger el precipitado. El sólido se lava con EtOAc, y se seca con alto vacío. El material bruto se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 36 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

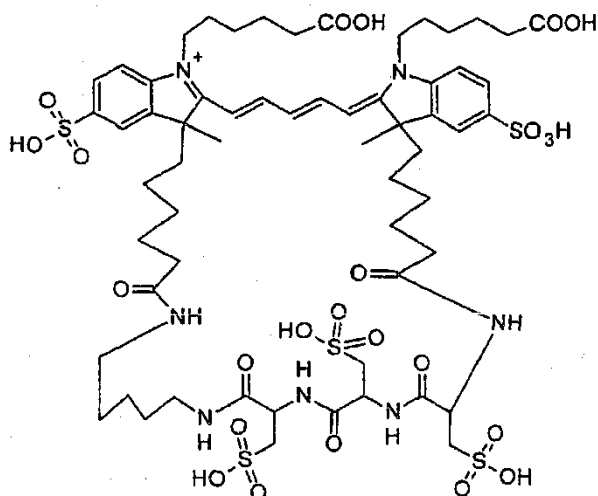
Ejemplo 37. Preparación del compuesto 37 (no está dentro de las reivindicaciones)



15 El compuesto 36 (500 mg) y el monohidrocloruro de malonaldehído de bis(fenilimina) (300 mg) se disuelven en anhídrido acético (1 ml), seguido de la adición de piridina (1 ml). La mezcla se calienta a 120°C durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se añade gota a gota en acetato de etilo. El colorante bruto se recoge por centrifugación y se lava con acetato de etilo dos veces. El material bruto se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 37 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

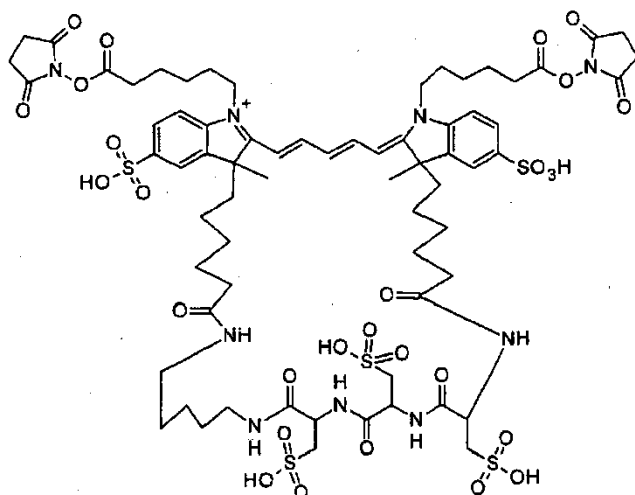
20

Ejemplo 38. Preparación del compuesto 38 (no está dentro de las reivindicaciones)



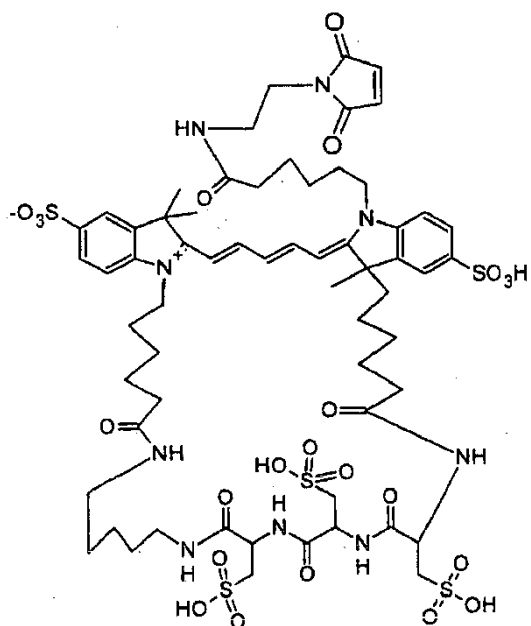
5 El compuesto 37 (20 mg) se disuelve en metanol (1 ml). A la solución se añade NaOH 0,1 M (0,5 ml) lentamente a temperatura ambiente. La mezcla se neutraliza con HCl 1 M a pH 6,0. Después de separar el disolvente, el residuo se purifica por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 38 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

Ejemplo 39. Preparación del compuesto 39 (no está dentro de las reivindicaciones)



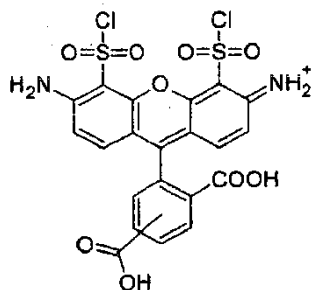
10 A una solución del compuesto 38 (10 mg) en DMF (0,4 ml) se añade tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (10 mg), seguido de trietilamina (0,1 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de la mezcla se vierte en EtOAc (15 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (3 x 10 ml), éter (3 x 10 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto 39 en forma de un polvo azul brillante.

Ejemplo 40. Preparación del compuesto 40 (no está dentro de las reivindicaciones)



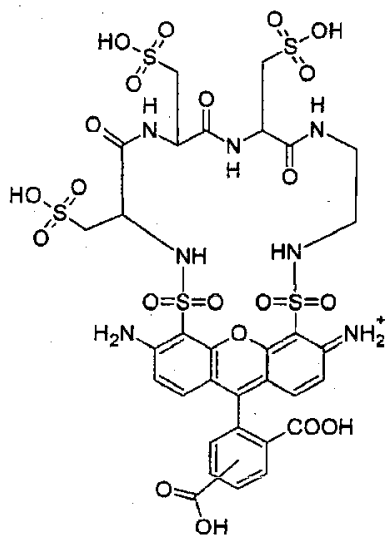
5 Al compuesto 34 (50 mg) en DMF (1 ml) a temperatura ambiente se añade trietilamina (0,1 ml) y N-(2-aminoetil)maleimida, sal del ácido trifluoroacético (50 mg). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La solución mezcla se vierte en EtOAc (25 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (3 x 10 ml), éter (3 x 10 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto bruto 40. El producto bruto se purifica por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 40 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

Ejemplo 41. Preparación del compuesto 41 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 41 se prepara como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 20080177086 (2008).

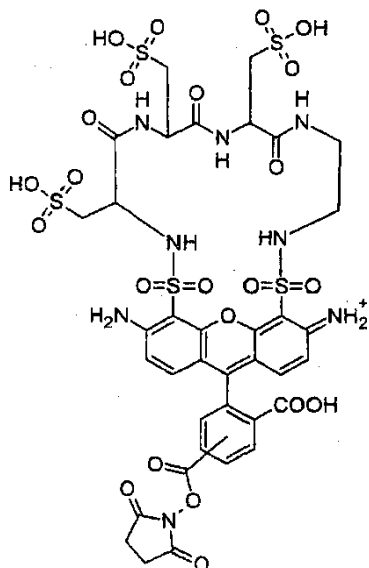
10 Ejemplo 42. Preparación del compuesto 42 (no está dentro de las reivindicaciones)



Los compuestos 41 (1 g) se disuelve en DMF anhidra (50 ml). A la solución en DMF de los compuestos 41 se añade lentamente solución en $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ del compuesto 13 (150 ml, pH ~9,0), y se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentra a ~5 ml, y se añade gota a gota a EtOAc-acetona 1:1 (250 ml), y se filtra para recoger el precipitado. El sólido se lava con EtOAc, y se seca con alto vacío. El material bruto se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 42 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

5

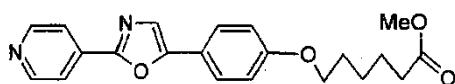
Ejemplo 43. Preparación del compuesto 43 (no está dentro de las reivindicaciones)



A una solución del compuesto 42 (10 mg) en DMF (0,4 ml) se añade tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (10 mg), seguido de trietilamina (0,1 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La solución mezcla se vierte en EtOAc (15 ml). El sólido se centrifuga y se lava con EtOAc (3 x 10 ml), éter (3 x 10 ml) y se seca a vacío para dar el compuesto 43.

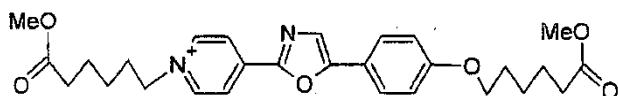
10

Ejemplo 44. Preparación del compuesto 44 (no está dentro de las reivindicaciones)



15 El compuesto 44 se prepara como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n° 20070077549 (2009).

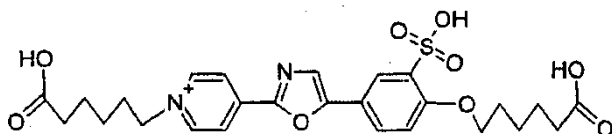
Ejemplo 45. Preparación del compuesto 45 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 44 (20 g) se suspende en 1,2-diclorobenceno (30 ml). A la suspensión se añade 6-bromohexanoato de metilo (30 ml). La mezcla de reacción se calienta a ~130°C hasta que el compuesto 44 se ha consumido mayoritariamente. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, y se vierte en EtOEt (500 ml). La suspensión de EtOEt se centrifuga para recoger el precipitado que se lava con EtOEt. El material bruto se purifica más por una columna de gel de sílice para dar el compuesto puro 45 usando un gradiente de cloroformo/metanol.

20

Ejemplo 46. Preparación del compuesto 46 (no está dentro de las reivindicaciones)

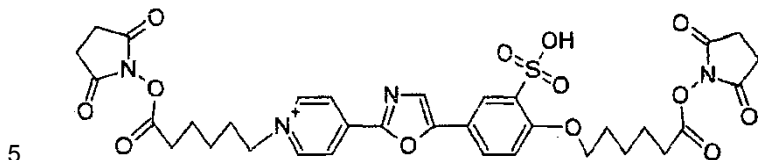


El compuesto 45 (10 g) se suspende en H_2SO_4 concentrado (5 ml). A la suspensión se añade H_2SO_4 fumante al 20% (10 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente hasta que la reacción se ha completado indicado por TLC. La mezcla de reacción se añade gota a gota a éter frío (500 ml) con agitación vigorosa para dar la mezcla bruta del compuesto 46 y su mono y diéster. El material bruto se suspende en HCl al 20%, y se calienta a ~60 °C

25

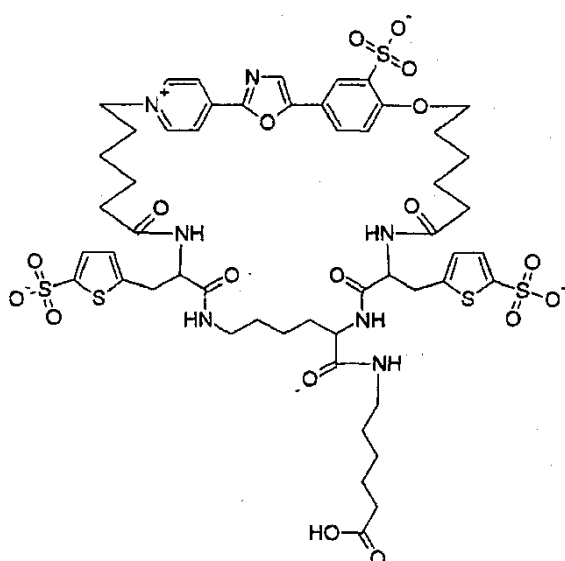
hasta que el monoéster y el diéster se han convertido mayoritariamente en el ácido libre. El material bruto se purifica más por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 46 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

Ejemplo 47. Preparación del compuesto 47 (no está dentro de las reivindicaciones)



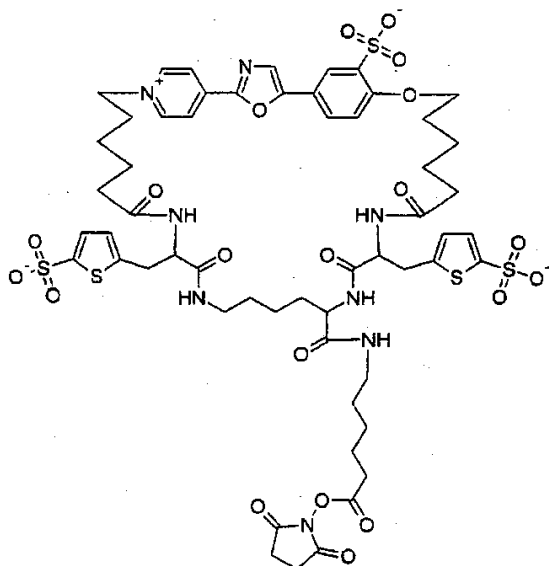
El compuesto 47 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 46 con tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio de acuerdo con el procedimiento del compuesto 39.

Ejemplo 48. Preparación del compuesto 48



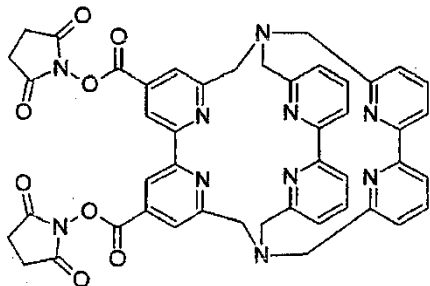
10 El compuesto bruto 47 (4 g) se disuelve en DMF anhidra (250 ml) y se añade lentamente una solución del compuesto 21 (3 g) en DMF anhidra (250 ml) [neutralizada con trietilamina a pH 8,0] se añade durante el periodo de 8 h. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. Después de separar el disolvente, el residuo se purifica por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 48 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN.

15 Ejemplo 49. Preparación del compuesto 49



El compuesto 49 se prepara de forma análoga a partir de la reacción del compuesto 48 con tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio de acuerdo con el procedimiento del compuesto 43.

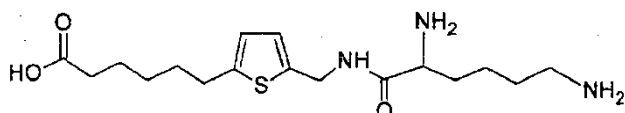
Ejemplo 50. Preparación del compuesto 50 (no está dentro de las reivindicaciones)



5

El compuesto 50 se prepara como se describe en patente de EE.UU. nº 5.162.508 (1992).

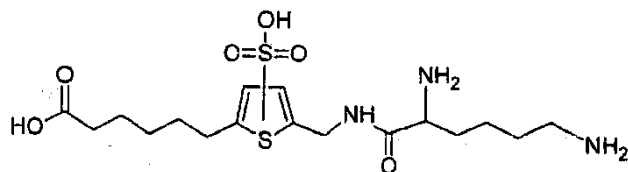
Ejemplo 51. Preparación del compuesto 51 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 51 se prepara de forma análoga a partir de la reacción de Boc-Lys(Boc)-OH con 2-aminometil-5-(5'-carboxipentil)tiofeno de acuerdo con el procedimiento del compuesto 14.

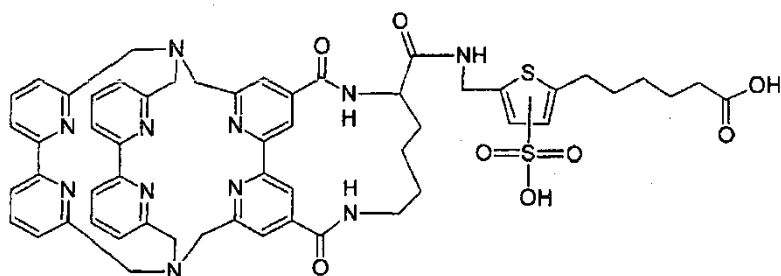
10

Ejemplo 52. Preparación del compuesto 52 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 52 se prepara de forma análoga a partir de la sulfonación del compuesto 51 de acuerdo con el procedimiento del compuesto 16.

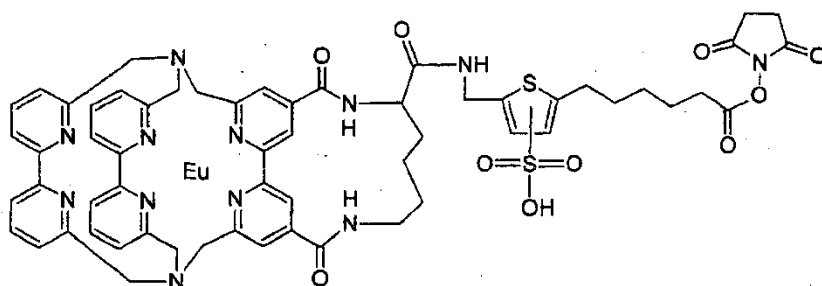
15 Ejemplo 53. Preparación del compuesto 53 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto bruto 50 (1 g) se disuelve en DMF anhidra (250 ml) y se añade lentamente una solución del compuesto 52 (450 mg) en DMF anhidra (250 ml) [neutralizada con trietilamina a pH 8,0] durante un periodo de 10 h. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. Después de separar el disolvente, el residuo se purifica por HPLC preparativa para dar el compuesto puro 53 usando el sistema de tampón de TFA al 0,1% en agua-TFA al 0,1% en MeCN. El compuesto purificado se vuelve a disolver en metanol, y se neutraliza a pH 7,0. La evaporación de la solución da compuesto 53 en forma de la sal de sodio.

20

Ejemplo 54. Preparación del compuesto 54 (no está dentro de las reivindicaciones)



El compuesto 53 se convierte in situ en su correspondiente complejo de Eu con EuCl_3 como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.162.508 (1992). El complejo de compuesto 53-Eu (10 mg) y carbonato de N,N'-disuccinimidilo (5 mg) se disuelven en DMF (0,5 ml). A la solución se añade 4-dimetilaminopiridina (0,5 mg) y piridina anhidra (0,5 ml) bajo protección de nitrógeno seco con agitación energética a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agita bajo protección de nitrógeno seco a temperatura ambiente hasta que la reacción se ha completado indicado por la HPLC. La mezcla de reacción se vierte en éter, y el precipitado resultante se recoge por filtración. El sólido se lava con éter para dar el compuesto 54 deseado.

Ejemplo 55. Preparación de un conjugado de péptido-colorante (no está dentro de las reivindicaciones)

- 10 A la aminofaloidina (5 mg) y el compuesto derivado de éster de succinimidilo 34 (10 mg) en DMF (0.5 ml) se añade N,N-diisopropiletilamina (25 μl). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. A esta solución se añade 5 ml de EtOAc. El sólido se recoge por centrifugación. El producto puro se purifica en SEPHADEX LH-20, eluyendo con agua seguido de HPLC preparativa para dar el conjugado de faloidina puro. El producto es un colorante eficaz para filamentos de F-actina en preparaciones de células fijadas.

- 15 Ejemplo 56. Preparación de conjugados de proteína-colorante

Se prepara una serie de conjugados de colorante y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (GAM), anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (GAR), estreptavidina, transferrina y otras proteínas, incluyendo R-ficoeritrina (R-PE) y alofococianina (APC) por métodos estándar (Haugland, et al., METH. MOL. BIOL., 45, 205 (1995); Haugland, METH. MOL. BIOL., 45, 223 (1995); Haugland, METH. MOL. BIOL., 45,235 (1995); Haugland, CURRENT PROTOCOLS IN CELL BIOLOGY, 16.5.1-16.5.22 (2000)), usando compuestos de éster de mono-succinimidilo o éster de bis-succinimidilo. El método típico de conjugación de proteína con ésteres de succinimidilo de la invención es como sigue. Son posibles variaciones en las proporciones de colorante a proteína, concentración de proteína, tiempo, temperatura, composición del tampón y otras variables, que son bien conocidas en la técnica, que todavía dan conjugados útiles. Se prepara una solución de la proteína a aproximadamente 10 mg/ml en bicarbonato sódico 0,1 M. Los reactivos de marcaje se disuelven en un disolvente adecuado tal como DMF o DMSO a aproximadamente 10 mg/ml. El agua es un disolvente adecuado para muchos colorantes de la invención. Se añaden cantidades predeterminadas de los reactivos de marcaje a las soluciones de proteína con agitación. Es típica una relación molar de 10 equivalentes de colorante a 1 equivalente de proteína, aunque la cantidad óptima varía con el reactivo de marcaje particular, la proteína que se está marcando y la concentración de proteína, y se determina de forma empírica.

30 Cuando se optimiza el rendimiento de la fluorescencia y se determina el efecto del grado de sustitución (DOS) en este brillo, es típico variar la relación del colorante reactivo a la proteína a lo largo de un intervalo de varias veces. La mezcla de reacción se incuba a temperatura ambiente durante una hora o sobre hielo durante varias horas. El conjugado de colorante-proteína típicamente se separa del reactivo libre sin reaccionar por cromatografía de exclusión por tamaños, tal como con la resina Amersham PD-10 equilibrada con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se recoge la banda coloreada que contiene proteína inicial y se determina el grado de sustitución a partir de la absorbancia y la absorbancia máxima de cada fluoróforo, usando el coeficiente de extinción del fluoróforo libre. El conjugado de colorante-proteína así obtenido se puede subfraccionar para dar conjugados con DOS mayor, menor o más uniforme.

- 40 A continuación se da un ejemplo específico de uso del compuesto 34 para preparar conjugado de IgG-colorante (no está dentro de las reivindicaciones):

Etapa 1. Preparación de la solución de proteína (solución A): Se mezclan 50 μl de NaHCO_3 1 M con 450 μl de solución de proteína IgG (4 mg/ml) para dar 0,5 ml de solución de muestra de proteína. La solución resultante debería tener pH $8,5 \pm 0,5$.

- 45 Etapa 2. Preparación de la solución de colorante (solución B): A 50 μl de DMSO se añade 1 mg de compuesto 34, y se agita hasta que el compuesto se ha disuelto completamente.

Etapa 3: Realización de la reacción de conjugación: Se añade la solución de colorante (B) a la solución de proteína (A) con agitación o balanceo eficaz, y se mantiene la mezcla de reacción agitada o balanceada durante 1-3 horas.

Etapa 4. Purificación del conjugado: a) Se diluye 10X tampón de elución con agua desionizada para dar tampón de elución 1X (solución C) que se usa para eluir el conjugado de proteína de la columna PD-10; b) Se carga la columna con la mezcla de reacción (de la etapa 3, filtrada si es necesario) o el líquido sobrenadante tan pronto como el líquido en la columna preempaquetada pasa justo por debajo de la superficie superior de la resina; c) Se añade 1 ml de tampón de elución 1X tan pronto como la muestra pasa justo por debajo de la superficie superior de la resina; Se repite el proceso de "lavado de la muestra" dos veces; Se añade más solución de tampón de elución 1X para eluir la muestra deseada; d). Se recoge la banda de recorrido más rápido que normalmente es colorante libre o hidrolizado hasta que se identifica el producto deseado.

Etapa 5. Caracterización del conjugado de colorante-proteína. a) Se mide la DO (absorbancia) a 280 nm y la longitud de onda de absorción máxima del colorante (Nota: para la mayoría de los espectrofotómetros, la muestra (de las fracciones de la columna) tiene que diluirse con agua desionizada de modo que los valores de DO estén en el intervalo de 0,1 a 0,9). La D.O. (absorbancia) a 280 nm es la absorción máxima de proteína (Nota: para obtener la DOS con precisión, se debe asegurar que el conjugado carece de colorante no conjugado); b). Se calcula el DOS usando la siguiente ecuación:

$$\text{DOS} = [\text{colorante}]/[\text{proteína}] = A_{\text{colorante}} \times \epsilon_p / 250000 (A_{280} - \text{CF} \times A_{\text{colorante}})$$

[colorante] es la concentración de colorante, y se puede calcular fácilmente a partir de la ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon_{\text{colorante}} \times C \times L$; [proteína] es la concentración de proteína objetivo. Este valor se puede calcular por el peso (añadido a la reacción) si la eficacia de la conjugación es suficientemente alta (preferiblemente >70%) o con más precisión calculada por la ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon_{\text{proteína}} \times C \times L$. Por ejemplo, la IgG tiene que tener el valor ϵ de $203.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. CF es el factor corrector de colorante, y se calcula por la relación de $\text{DO}_{280 \text{ nm}}/\text{DO}_{\text{colorante}}$ a la longitud de onda de absorción máxima.

Ejemplo 57. Marcaje fluorescente de proteínas oxidadas con peryodato (no está dentro de las reivindicaciones)

Dos muestras de 5 mg cada una de anticuerpo IgG de cabra en 1 ml de acetato sódico 0,1 M, NaCl 0,135 M, pH 5,5, se tratan con 2,1 mg de metaperoyrato sódico sobre hielo, durante 1 y 2 horas, respectivamente. Las reacciones se detienen por adición de 30 μl de etilenglicol. Los anticuerpos se purifican en una columna Sephadex G25 empaquetada en PBS a pH 7,2. Se añade una décima parte de volumen de bicarbonato sódico 1 M para elevar el pH y se añaden el compuesto 102 o 117 en una relación molar de colorante a proteína de 50:1. La reacción se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añade cianoborohidruro sódico a una concentración final 10 mM y la reacción se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. Los conjugados de anticuerpo se purifican por diálisis en columnas Sephadex G25 como se ha descrito antes. Los anticuerpos que se oxidan durante 1 hora típicamente dan un grado de sustitución de 1 mol de colorante por mol de IgG. Los anticuerpos que se oxidan durante 2 horas típicamente dan un DOS de aproximadamente 2 moles de colorante por mol de IgG. Las proteínas oxidadas con peryodato en geles y en transferencias también se pueden marcar, esencialmente como se describe en Estep et al., ANAL. BIOCHEM., 157, 100-105 (1986).

Ejemplo 58. Marcaje de beta-galactosidasa con un colorante reactivo con tiol (no está dentro de las reivindicaciones)

Se prepara una solución de beta-galactosidasa, una proteína rica en grupos tiol, en PBS (2,0 mg en 400 μl). Después la solución de proteína se trata con una solución de 20 mg/mL del compuesto derivado de maleimida 40 en DMF. El colorante sin reaccionar se separa en una columna de centrifugación. El grado de sustitución por el colorante se calcula usando el coeficiente de extinción del colorante libre como se describe en el ejemplo 56. La concentración de proteína se calcula a partir de la absorbancia a 280 nm, corregida para la absorbancia del compuesto 40 a esa longitud de onda.

Ejemplo 59. Comparación de conjugados de proteína preparados a partir de colorantes no reticulados con los colorantes reticulados con WSB

Los conjugados de colorante-proteína se sintetizan como se describe en el ejemplo 56 y se conjugan con GAR con diferentes DOS. Las figuras 1-3 son la comparación directa de las propiedades de fluorescencia de conjugados GAR preparados a partir del colorante no reticulado SE, colorante SE reticulado con un puente hidrófobo y colorante SE reticulado con un WSB de esta invención. Se puede ver que la reticulación con WSB ha dado como resultado una mejora significativa del rendimiento de fluorescencia de los compuestos colorantes. La emisión de fluorescencia más brillante de los compuestos con WSB se observa en todos los DOS ensayados.

Ejemplo 60. Transferencia de energía de fluorescencia en conjugados de R-ficoeritrina y alofococianina (no está dentro de las reivindicaciones)

Se prepara el conjugado de R-ficoeritrina (R-PE) de los compuestos SE colorantes como en el ejemplo 56 con una DOS suficientemente alta para amortiguar la fluorescencia del donador casi completamente (DOS de aproximadamente 4-8). El conjugado de fibobiliproteína se excita a 488 nm y la fluorescencia de emisión se compara con la de la R-ficoeritrina excitada a la misma longitud de onda. Se produce transferencia de energía altamente eficiente (>99%) de la proteína al colorante fluorescente. Se prepara un conjugado de estos complejos con

estreptavidina esencialmente como describen (METH. MOL. BIOL., 45, 205 (1995)). Este conjugado de estreptavidina retiene las propiedades de transferencia de energía y es útil para la tinción de células en citómetros de flujo que usan láser de ion argón para la excitación. También se pueden hacer conjugados en tándem de alofocianina, con colorantes de longitudes de onda más largas de la invención tales como el compuesto 34 o 39 que da emisión más allá de 700 nm cuando se excita cerca de 633 nm.

Ejemplo 61. Marcaje de actina en células de mamífero cultivadas (no está dentro de las reivindicaciones)

Células de arteria pulmonar bovina (BPAEC) se cultivan al 30-50% de confluencia sobre vidrio. Las células se fijan con formaldehído al 3,7%, se permeabilizan con Triton X-100 al 0,2% y se bloquean con BSA al 6%. Las células se incuban con el conjugado de colorante de faloidina del ejemplo 55. Las células se aclaran con tampón de bloqueo y se montan en PBS a pH 7,4. Las células teñidas presentan filamentos de actina decorados con fluorescencia roja.

Ejemplo 62. Preparación y uso de una tiramida fluorescente (no está dentro de las reivindicaciones)

Se añade un exceso molar de 2 veces de hidrocloreto de tiramina al compuesto 34 en solución acuosa a temperatura ambiente, seguido de un exceso de trietilamina. Después de 30 minutos, precipita el sólido rojo con acetona, se lava con éter y se purifica por HPLC preparativa. Se cultivan células arteriales pulmonares bovinas (BPAEC) hasta 30-50% de confluencia sobre vidrio. Las células se fijan con formaldehído al 3,7%, se permeabilizan con Triton X-100 al 0,2% y se bloquean con estreptavidina 1 mg/ml y biotina 1 mM. Después de lavado, las células se exponen a anticuerpo anti-citocromo C oxidasa (anti-COX) biotilada aproximadamente 0,05 µg/ml, y después se incuban con conjugado de estreptavidina-HRP a temperatura ambiente. Las células se aclaran de nuevo. Después la muestra se incuba con tiramida del compuesto 34 y se examinan usando microscopía de fluorescencia.

Ejemplo 63. Preparación de conjugados de colorante y aminodextrano

Aminodextrano de PM 70.000 (50 mg) derivatizado con una media de 13 grupos amino se disuelve a 10 mg/ml en NaHCO₃ 0,1 M. Se añade un compuesto SE colorante para dar una relación de colorante/dextrano de aproximadamente 10-15. Después de 6-12 horas el conjugado se purifica en SEPHADEX G-50, eluyendo con agua. Típicamente se conjugan 4-6 de colorante con dextrano PM 70.000 MW.

Ejemplo 64. Preparación de microesferas marcadas con colorante fluorescente

Microesferas uniformes se modifican químicamente para tener grupos funcionales tales como amino o carboxilo o aldehído. Estas microesferas funcionalizadas se conjugan covalentemente con los correspondientes colorantes reactivos como se cita en la tabla 1. Por ejemplo, las microesferas modificadas con amina se conjugan fácilmente para dar los colorantes de la invención a través de ésteres de succinimidilo tales como los compuestos 34 (no está dentro de las reivindicaciones), 39 (no está dentro de las reivindicaciones), 49 y 54 (no está dentro de las reivindicaciones). Una proteína marcada con colorante se acopla covalentemente por sus restos amina a los grupos carboxilato del polímero usando 3-(dimetilaminopropil)carbodiimida de etilo (EDAC).

Ejemplo 65. Preparación de conjugados de bacterias-colorante

Se suspenden *Escherichia coli* muertas con calor a 10 mg/ml en tampón a pH 8-9, y se incuban con un colorante reactivo con amina 0,5-1,0 mg/ml, típicamente un derivado de éster de succinimidilo (tal como el compuesto 34 (no está dentro de las reivindicaciones), 39 (no está dentro de las reivindicaciones), 49 y 54 (no está dentro de las reivindicaciones)). Después de 30-60 minutos las bacterias marcadas se centrifugan y se lavan varias veces con tampón para separar cualquier colorante no conjugado. Las bacterias marcadas se analizan por citometría de flujo.

Ejemplo 66. Preparación de conjugados de nucleótido colorante

A 2 mg de 5'-trifosfato de 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina (Sigma Chemical) en 100 µl de agua se añade el compuesto 34 (no está dentro de las reivindicaciones), 39 (no está dentro de las reivindicaciones), 49 o 54 (no está dentro de las reivindicaciones) en 100 µl de DMF y 5 µl de trietilamina. Después de 3 horas la solución se evapora y el residuo se purifica por HPLC.

Las fracciones de producto se liofilizan para dar el conjugado de nucleótido fluorescente. Alternativamente, los conjugados de nucleótidos fluorescentes del 5'-trifosfato de desoxiuridina se preparan a partir del 5'-trifosfato de 5-(3-amino-1-propinil)-2'-desoxiuridina, o por tratamiento de un nucleótido tiolado o un tiofosfato de nucleótido con un colorante reactivo con tiol de la invención (tal como el compuesto 101). Adicionalmente, se hace reaccionar 5'-trifosfato de 2'-(o 3')-2-aminoetilaminocarboniladenosina con un ligero exceso del compuesto 34 (no está dentro de las reivindicaciones), 39 (no está dentro de las reivindicaciones), 49 o 54 (no está dentro de las reivindicaciones) y, después de precipitación con etanol, el producto modificado con ribosa se purifica por HPLC preparativa. El experto en la técnica puede preparar fácilmente nucleótidos conjugados con los colorantes de la invención, siguiendo los procedimientos publicados, tales como por Nimmakayalu M, et al., BIOTECHNIQUES, 28, 518-522 (2000); Giaid A, et al. HISTOCHEMISTRY, 93, 191-196 (1989).

Ejemplo 67. Preparación de un conjugado de oligonucleótido-colorante

Una secuencia de cebador M13 de 18 bases, modificada con 5'-amina (aproximadamente 100 µg) se disuelve en 4 µl de agua. A esta se añaden 250 µg de compuesto 34 (no está dentro de las reivindicaciones), 39 (no está dentro de las reivindicaciones), 49 o 54 (no está dentro de las reivindicaciones) en 100 µl de borato sódico 0,1 M, pH 8,5. Después de 16 horas, se añaden 10 µl de NaCl 5 M y 3 volúmenes de etanol frío. La mezcla se enfría a -20°C, se centrifuga, el líquido sobrenadante se decanta, el sedimento se aclara con etanol y después se disuelve en 100 µl de agua. El oligonucleótido marcado se purifica por HPLC. El pico deseado se recoge y se evapora para dar el oligonucleótido fluorescente.

Ejemplo 68. Hibridación in situ de una sonda de ARN

Se fijan y preparan fibroblastos de ratón para la hibridación in situ de mRNA usando procedimientos estándar. Se prepara una sonda de ARN marcada con colorante por transcripción in vitro de un plásmido que contiene el gen estructural de actina del ratón en la dirección 3' de un promotor de ARN polimerasa de fago T3. Las reacciones de marcaje comprenden combinar 2 µl de molde de ADN (1 µg de ADN), 1 µl de cada uno de ATP, CTP y GTP 10 mM, 0,75 µl de UTP 10 mM, 2,5 µl de UTP marcado con aminoalilo 1 mM, 2 µl de 10X tampón de transcripción (Tris 400 mM, pH 8,0, MgCl₂ 100 mM, espermidina 20 mM, NaCl 100 mM), 1 µl de ARN polimerasa de T3 (40 unidades/µl), 1 µl de BSA 2 mg/ml, y 8,75 µl de agua. Las reacciones se incuban a 37°C durante dos horas. El molde de ADN se separa por tratamiento con 20 unidades de DNasa I durante 15 minutos, a 37°C. El transcrito de ARN se purifica por extracción con un volumen igual de fenol:cloroformo 1:1, y después por cromatografía en SEPHADEX G50. El ARN marcado se desnaturaliza durante 5 minutos a 50°C y después se hibrida con preparaciones celulares usando procedimientos estándar.

Ejemplo 69. Preparación de sondas de hibridación de ADN usando ADN modificado con amina y un colorante reactivo con amina de la invención

El traslado de mella se lleva a cabo usando el ADN plásmido pUC1.77 que contiene una sonda alfa-satélite de cromosoma 1 humano. En un tubo de microcentrífuga se añaden, en el siguiente orden: 23,5 µL de agua, 5 µl 10X tampón de traslado de mella (Tris-HCl 0,5 M, MgCl₂ 50 mM, BSA 0,5 mg/ml, pH 7,8), 5 µl de DTT 0,1 M, 4 µl de mezcla de d(GAC)TP (dATP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM), 1 µl de dTTP 0,5 mM, 4 µl de aminoalil-dUTP 0,5 mM, 1 µl de molde de ADN 1 µg/µl, 5 µl de DNasa I (1 µg/ml, 2000 Kunitz unidades/mg), 1,5 µl de ADN polimerasa I (10 U/µl). El tubo se incuba 2 horas a 15°C, y después se lleva a un volumen final de 100 µl con agua. El ADN modificado con amina se purifica usando un kit de purificación QIAQUICK PCR (Qiagen). El ADN modificado con amina se vuelve a suspender en 5 µl de agua. A la solución se añaden 3 µl de bicarbonato sódico 25 mg/ml y 50 µg de compuesto 34 (no está dentro de las reivindicaciones), 39 (no está dentro de las reivindicaciones), 49 o 54 (no está dentro de las reivindicaciones) en 5 µl de DMF. La reacción se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad, se añaden a la reacción 90 µl de agua, y se purifica usando un kit de purificación de PCR Qiagen. Los productos de ADN marcados son adecuados para los experimentos de hibridación in situ, uso de micromatrices y donadores o aceptores de fluorescencia en ensayos basados en hibridación.

Ejemplo 70. Tinción de células con tándem de estreptavidina marcada con colorante

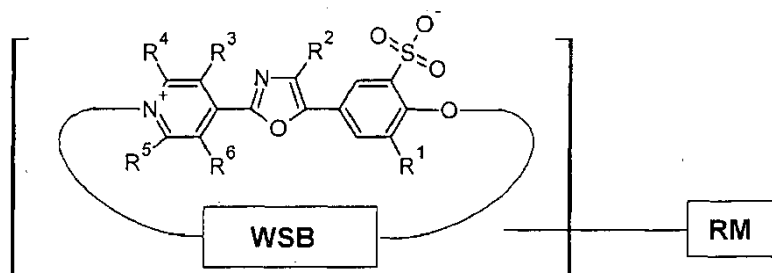
Se lavan células Jurkat dos veces con BSA/PBS al 1% y se vuelven a suspender en una concentración de 1×10^7 células/ml. Después las células Jurkat se incuban sobre hielo durante 60 minutos con anticuerpo de ratón anti-CD4 humano-biotina en la concentración recomendada de 10 µl para 1×10^6 células. Después de incubación con el anticuerpo primario, las células se lavan con BSA/PBS al 1% y se incuban sobre hielo durante 30 minutos con el conjugado fluorescente de estreptavidina-ficoeritrina del ejemplo 59. Las células se lavan con BSA/PBS al 1%, se centrifugan y se vuelven a suspender con 400 µl de BSA/PBS al 1%. Las muestras se analizan en un citómetro de flujo BD Calibur con excitación con la línea de 488 nm de un láser de argón o la línea de 633 nm del láser de He-Ne, recogiendo la emisión por un filtro de paso banda. Usando una gráfica de puntos de FSC frente a SSC las células vivas son reguladas y se mide la media geométrica de la fluorescencia. Los datos se analizan tanto por intensidad de fluorescencia como por la relación señal/ruido.

Ejemplo 71. Caracterización de conjugados de CD4, CD 8 y CD45 por citometría de flujo

Sangre humana normal, recogida en EDTA, se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos con los conjugados de anticuerpo de ratón anti-CD4, CD8 o CD45 humano del compuesto 34 (no está dentro de las reivindicaciones), 39 (no está dentro de las reivindicaciones), 43 (no está dentro de las reivindicaciones) o 49 en la concentración de 1 µg para 1,1 ml de sangre. Después de incubación con el conjugado de anticuerpo, la sangre se suspende en un volumen de 20 veces (2 ml) de solución de BD FACSLysing y se incuba durante 8-10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugan a 2-300 x g durante 5 minutos, el líquido sobrenadante se decanta y el sedimento se suspende y se lava con 2 ml de BSA/PBS al 0,5%. El líquido sobrenadante se decanta de nuevo y el sedimento se suspende en 0,5 ml de BSA/PBS al 0,5% para el análisis en un citómetro de flujo BD LSR II. El análisis se lleva a cabo de modo que las muestras se excitan con la línea de 405 nm de un láser violeta, línea de 488 nm de un láser de argón o línea de 633 nm de un láser de He-Ne, recogiendo la emisión un filtro de paso banda adecuada. Usando una gráfica de puntos de FSC frente a SSC los linfocitos son regulados y se mide la fluorescencia mediana. La figura 10 indica que los conjugados de anticuerpo de ratón anti-CD4, CD8 y CD45 humano son muy fluorescentes, dando buena señal de tinción para el análisis de células.

REIVINDICACIONES

1. Un colorante luminiscente químicamente reactivo, que tiene la fórmula:



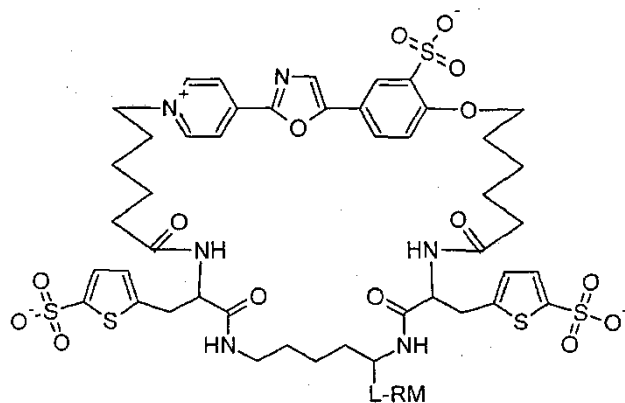
5 en donde de R¹ a R⁶ son independientemente un hidrógeno, un alquilo que tiene 1-20 carbonos, un alcoxi que tiene 1-20 carbonos, un trifluorometilo, un halógeno, un metilitio, un sulfonilo, un boronilo, un fosfonilo, un ciano, un carbonilo, un hidroxilo, un amino, un tiol, un arilo, un heteroarilo, o un RM; RM es un resto química reactivo; y WSB es un puente soluble en agua que reticula dos anillos diferentes del colorante luminiscente y contiene al menos un grupo sulfonato o fosfonato.

10 2. El colorante luminiscente químicamente reactivo de la reivindicación 1, en donde RM es una amina, un ácido carboxílico, un éster de un ácido carboxílico activado, una halogenoacetamida, una hidrazina, una hidroxilamina, un isotiocianato, una maleimida o un haluro de sulfonilo.

3. El colorante luminiscente químicamente reactivo de la reivindicación 1 o 2, en donde el WSB contiene al menos dos grupos seleccionados de grupos sulfonato y fosfona.

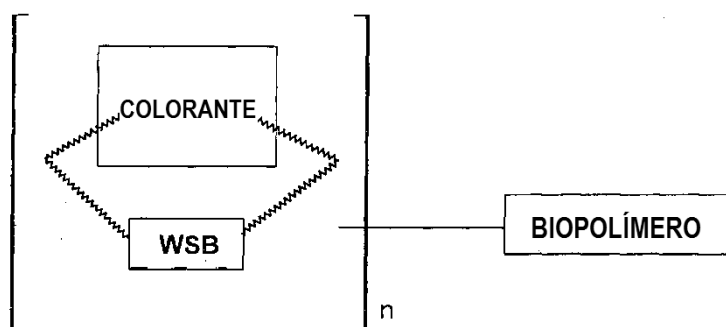
15 4. El colorante luminiscente químicamente reactivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el WSB contiene RM.

5. El colorante luminiscente químicamente reactivo de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



20 en donde L es un conector de 0-30 átomos de longitud; y RM es una amina, un ácido carboxílico, un éster de un ácido carboxílico activado, una halogenoacetamida, una hidrazina, una hidroxilamina, un isotiocianato, una maleimida o un haluro de sulfonilo.

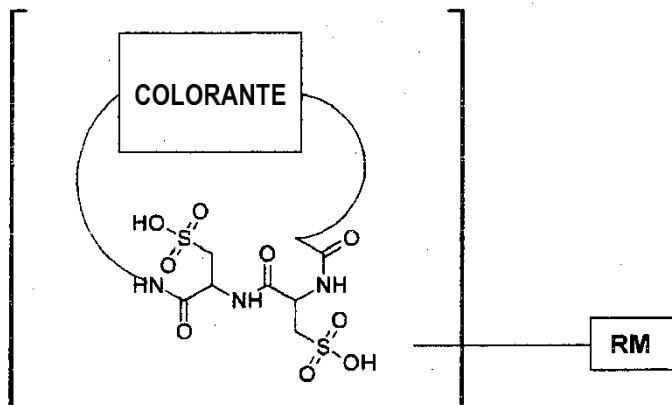
6. Un conjugado que tiene la fórmula:



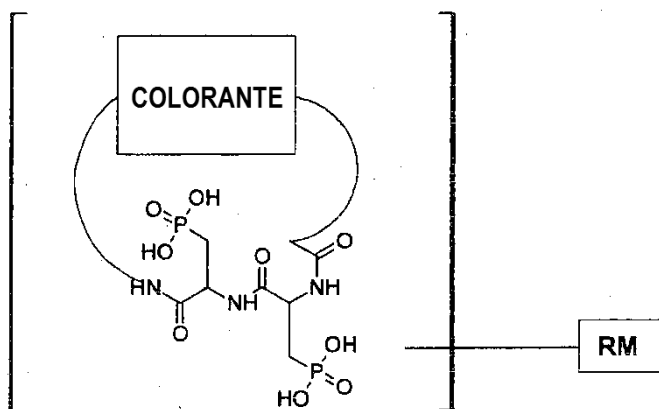
en donde COLORANTE representa un colorante luminiscente que es una oxazina o un oxazol; WSB es un puente soluble en agua que reticula dos anillos diferentes del colorante luminiscente y contiene al menos un grupo sulfonato o fosfonato; BIOPOLÍMERO es una sustancia biológica que tiene un peso molecular mayor que 1000 daltons; n es un número entero de 1-30 con la condición de que el COLORANTE esté covalentemente conectado con el BIOPOLÍMERO directa o indirectamente por un conector "L"; y L es un conector de 0-30 átomos de longitud.

5

7. El conjugado de la reivindicación 6, en donde dicho conjugado deriva de la reacción de un colorante luminiscente químicamente reactivo que tiene una fórmula seleccionada de la fórmula 2:

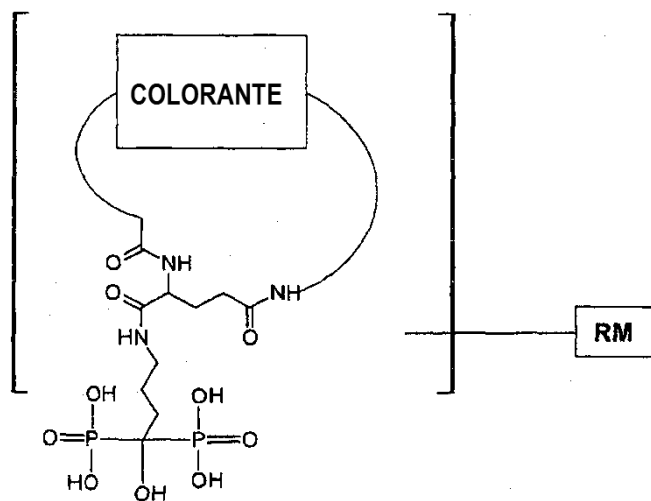


Fórmula 3:

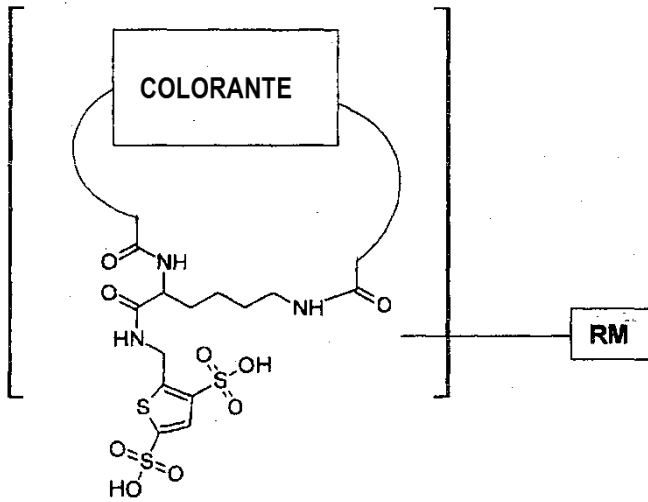


10

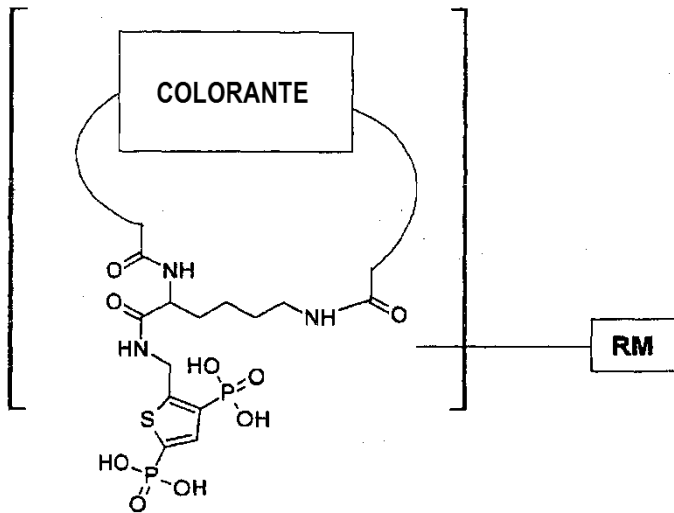
Fórmula 4:



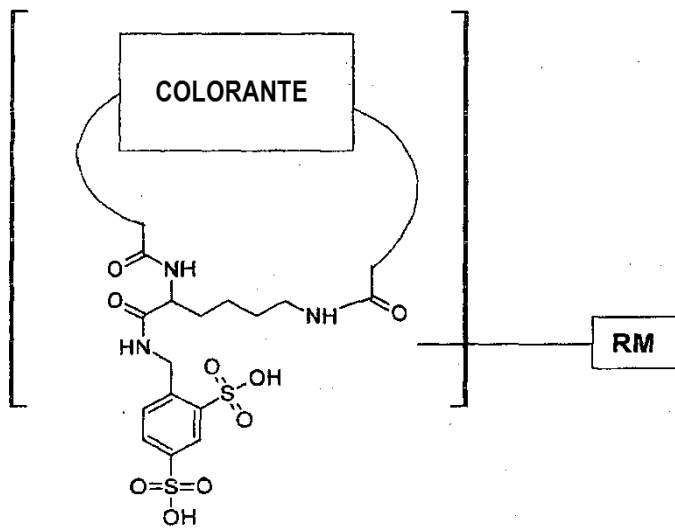
Fórmula 5:



Fórmula 6:

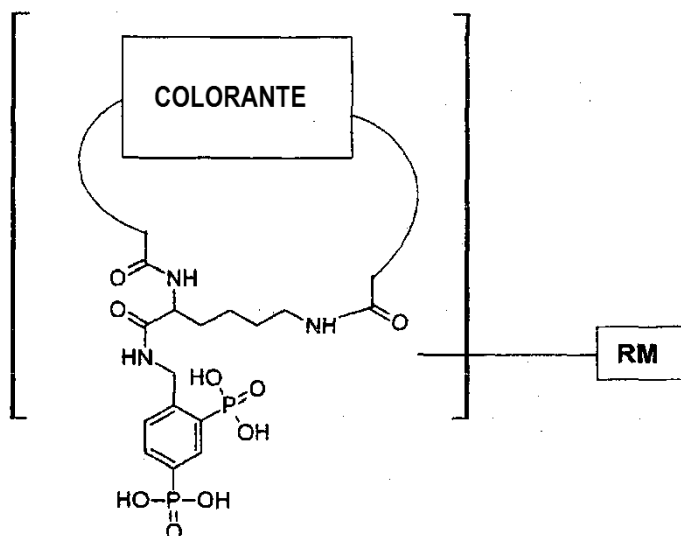


Fórmula 7:



, y

Fórmula 8



en donde RM es una acrilamida, una amina, un ácido carboxílico, un éster de ácido carboxílico activado, una acilazida, un acil-nitrilo, un aldehído, un haluro de alquilo, un anhídrido, un haluro de arilo, una azida, una aziridina, un boronato, un diazoalcano, una halogenoacetamida, una halogenotriazina, una hidrazina, una hidroxilamina, un imido éster, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un complejo de platino reactivo, un haluro de sulfonilo o un derivado de psoraleno; y el BIOPOLÍMERO.

8. El conjugado de la reivindicación 6, en donde el BIOPOLÍMERO es un péptido, una proteína, un polisacárido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un lípido, un fosfolípido, una lipoproteína, un lipopolisacárido, un liposoma, un polímero lipófilo, una micropartícula polimérica, una célula animal, una célula vegetal, una bacteria, una levadura o un virus.

9. El conjugado de la reivindicación 6, en donde el compuesto es el conjugado y en donde el BIOPOLÍMERO es el anticuerpo.

10. Un método para detectar un miembro complementario de una pareja de unión específica en una muestra que comprende:

a) añadir a dicha muestra el conjugado de la reivindicación 6, en donde dicho BIOPOLÍMERO comprende un miembro de dicha pareja de unión específica;

b) permitir suficiente tiempo para que el conjugado forme un complejo con el miembro complementario en dicha muestra, presentando dicho complejo una respuesta de fluorescencia detectable; y

c) detectar el complejo para localizar el miembro complementario con un instrumento de fluorescencia.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el primer miembro de la pareja de unión específica es un péptido, una proteína, un oligonucleótido, un polímero de ácido nucleico o un polisacárido.

12. El método de la reivindicación 10, en donde el primer miembro de la pareja de unión específica comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una avidina, una estreptavidina, una lectina o una enzima.

13. Un método de seguimiento de una función celular que comprende:

a) añadir el conjugado de la reivindicación 6 a una muestra que contiene una célula, en donde dicho BIOPOLÍMERO comprende un miembro de una pareja de unión específica, y en donde dicha célula contiene el otro miembro de dicha pareja de unión específica;

b) incubar la muestra durante un tiempo suficiente para que dicho conjugado forme un complejo con dicho otro miembro de dicha pareja de unión específica;

c) iluminar la muestra a una longitud de onda que genera una respuesta de fluorescencia del conjugado;

d) detectar una respuesta de fluorescencia del conjugado; y

e) correlacionar la respuesta de fluorescencia con una función celular.

14. El método de la reivindicación 13, que además comprende:

a) estimular la célula;

b) vigilar los cambios en la intensidad de la respuesta de fluorescencia de dicho conjugado; y

c) correlacionar los cambios en la intensidad de la fluorescencia con una función celular.

5 15. Un kit para llevar a cabo un ensayo celular, que comprende el conjugado de la reivindicación 6 y un segundo componente del ensayo.

16. El kit de la reivindicación 15, en donde el segundo componente del ensayo es un tampón biológico.

Figura 1

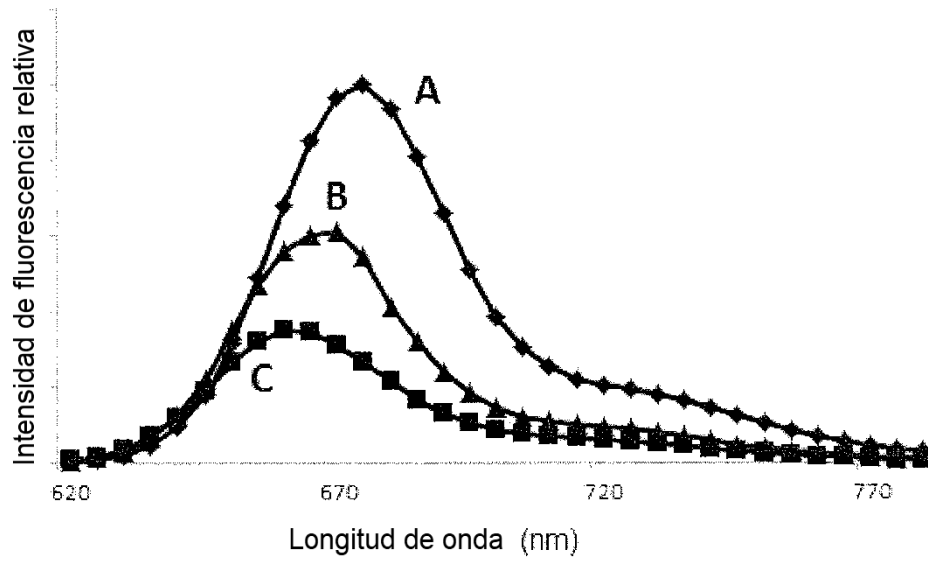


Figura 2

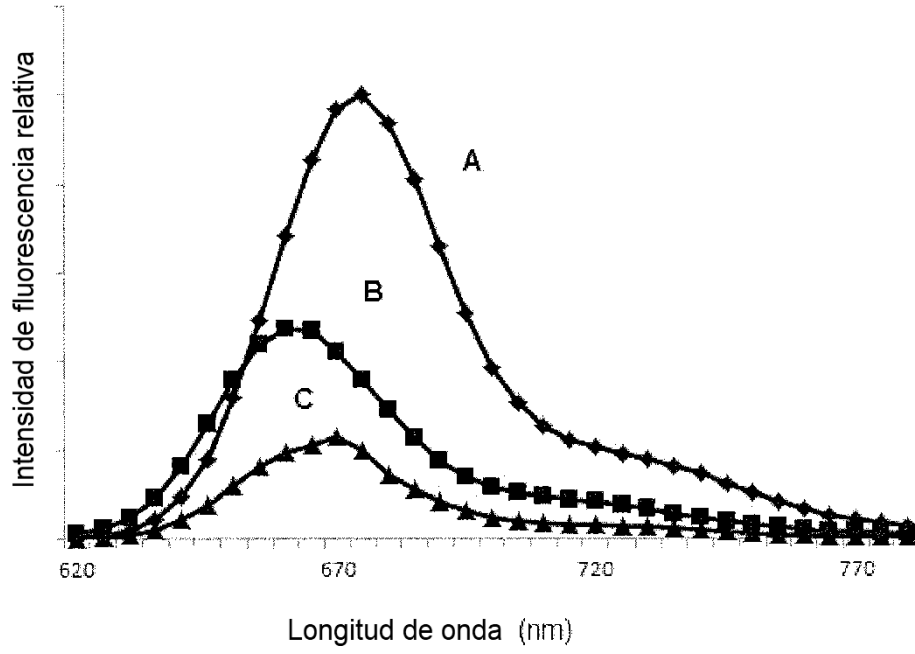


Figura 3

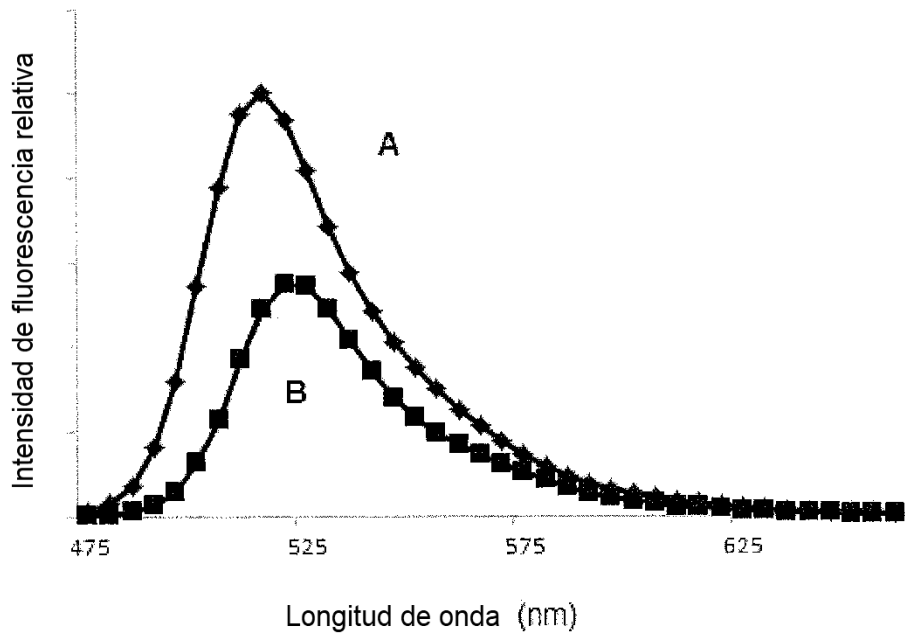


Figura 4

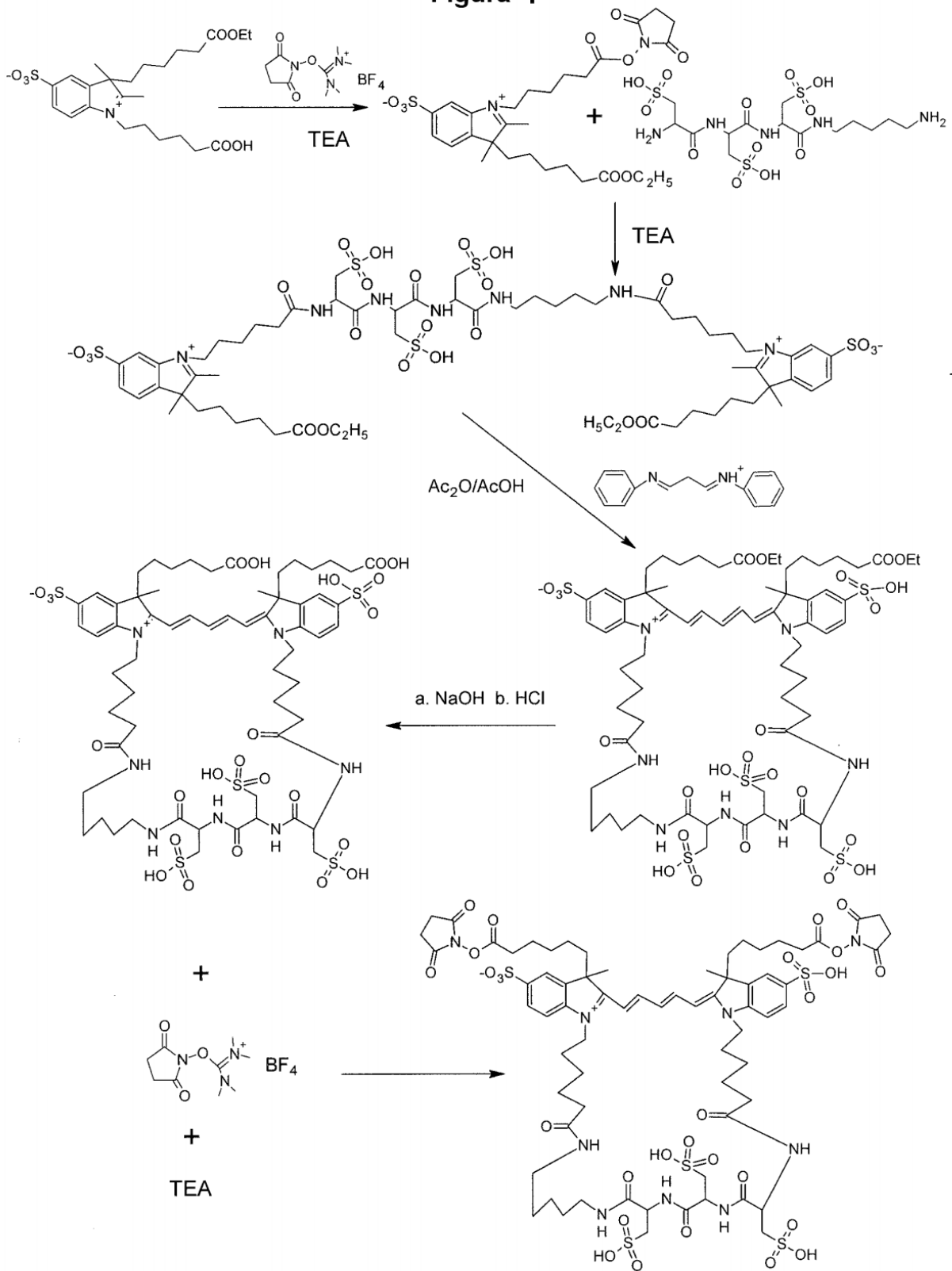


Figura 6

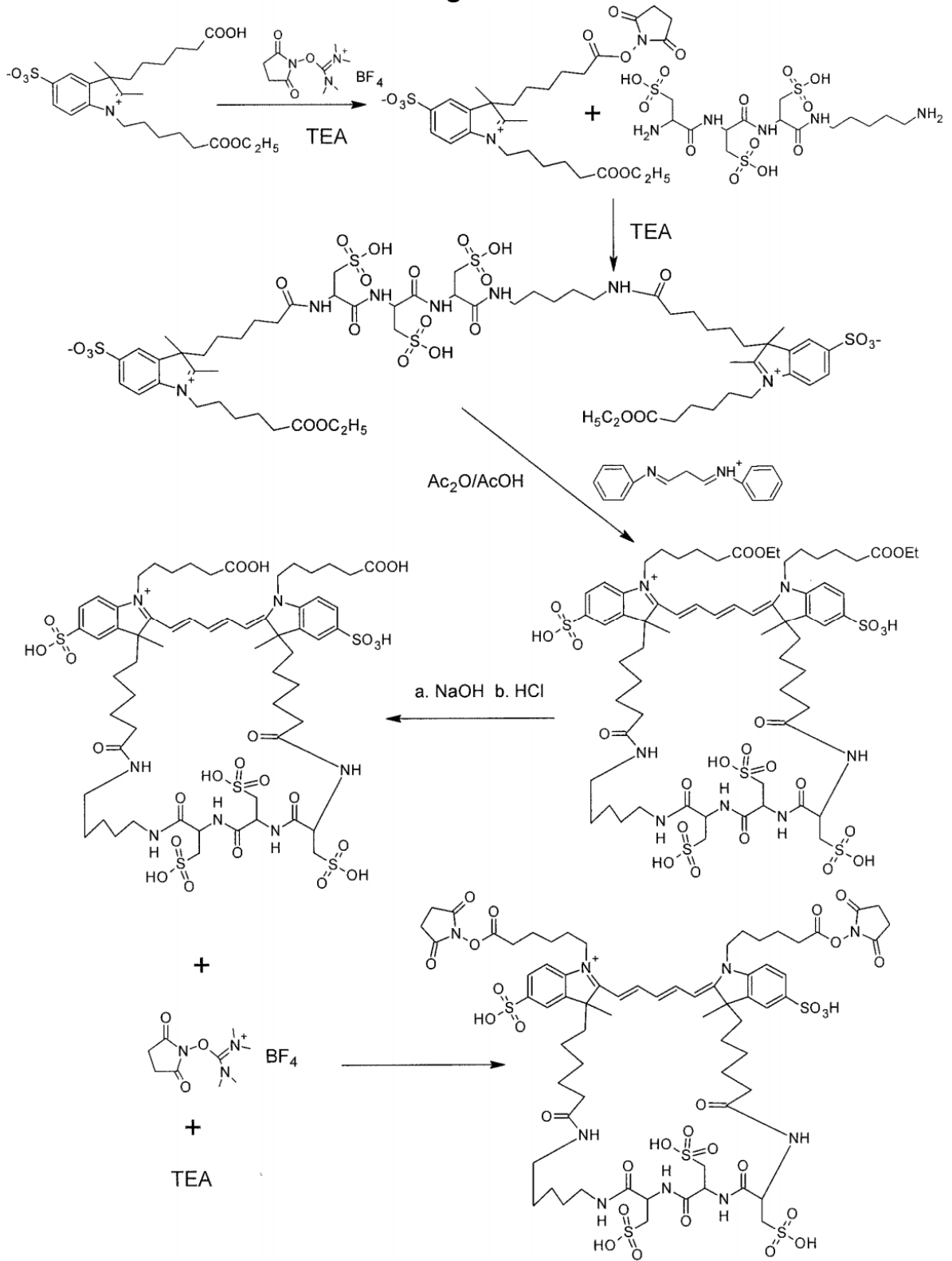


Figura 7

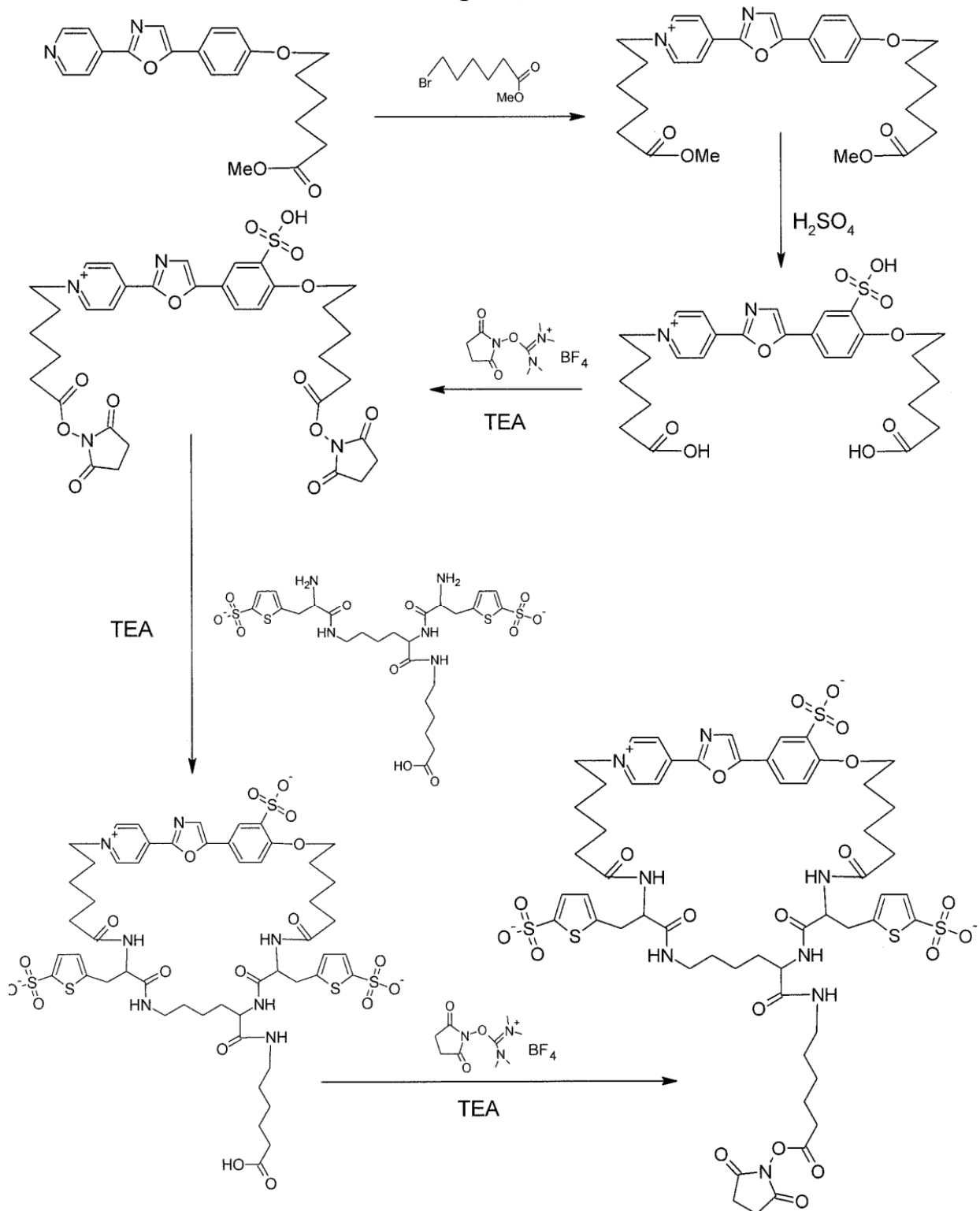


Figura 8

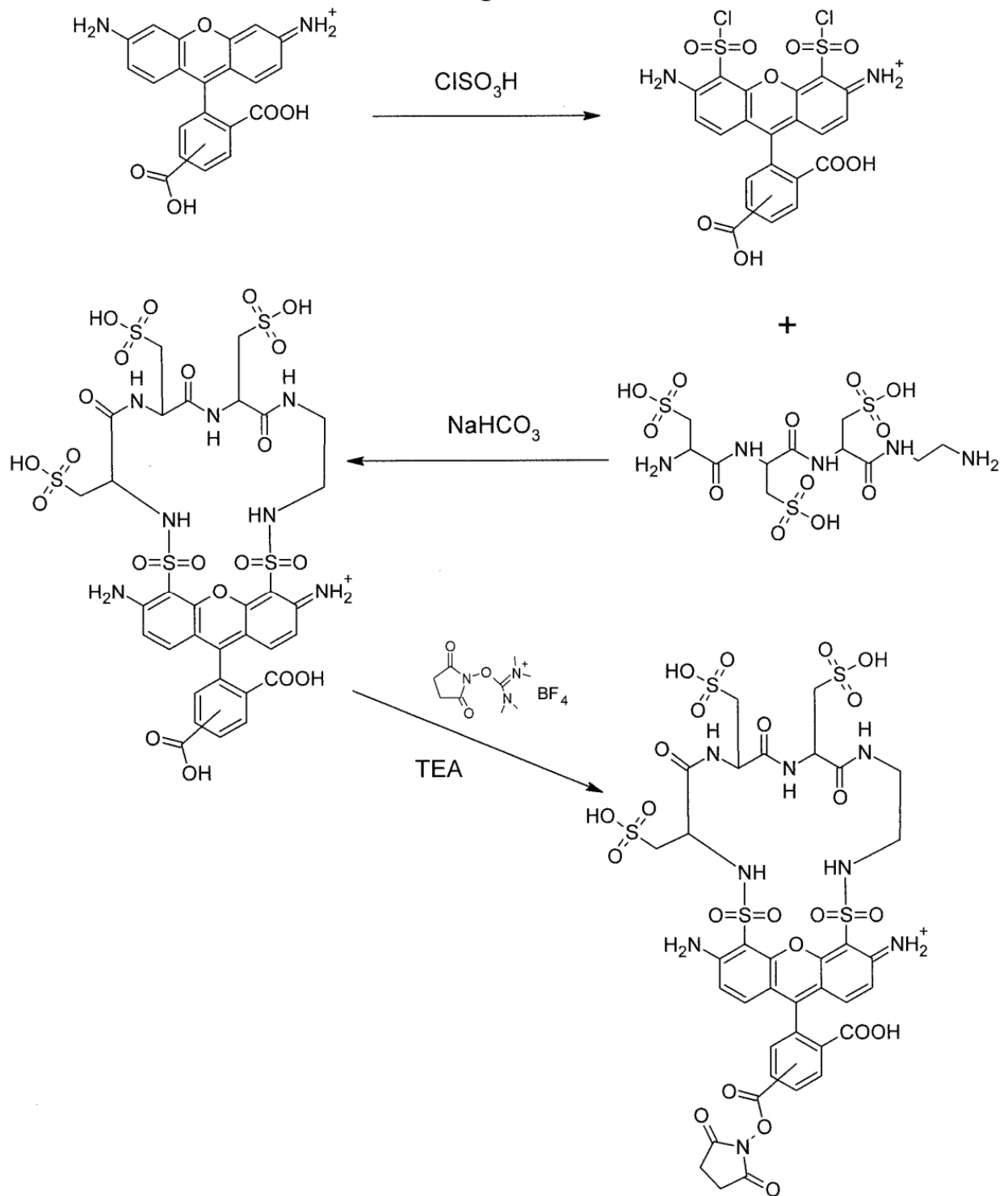


Figura 9

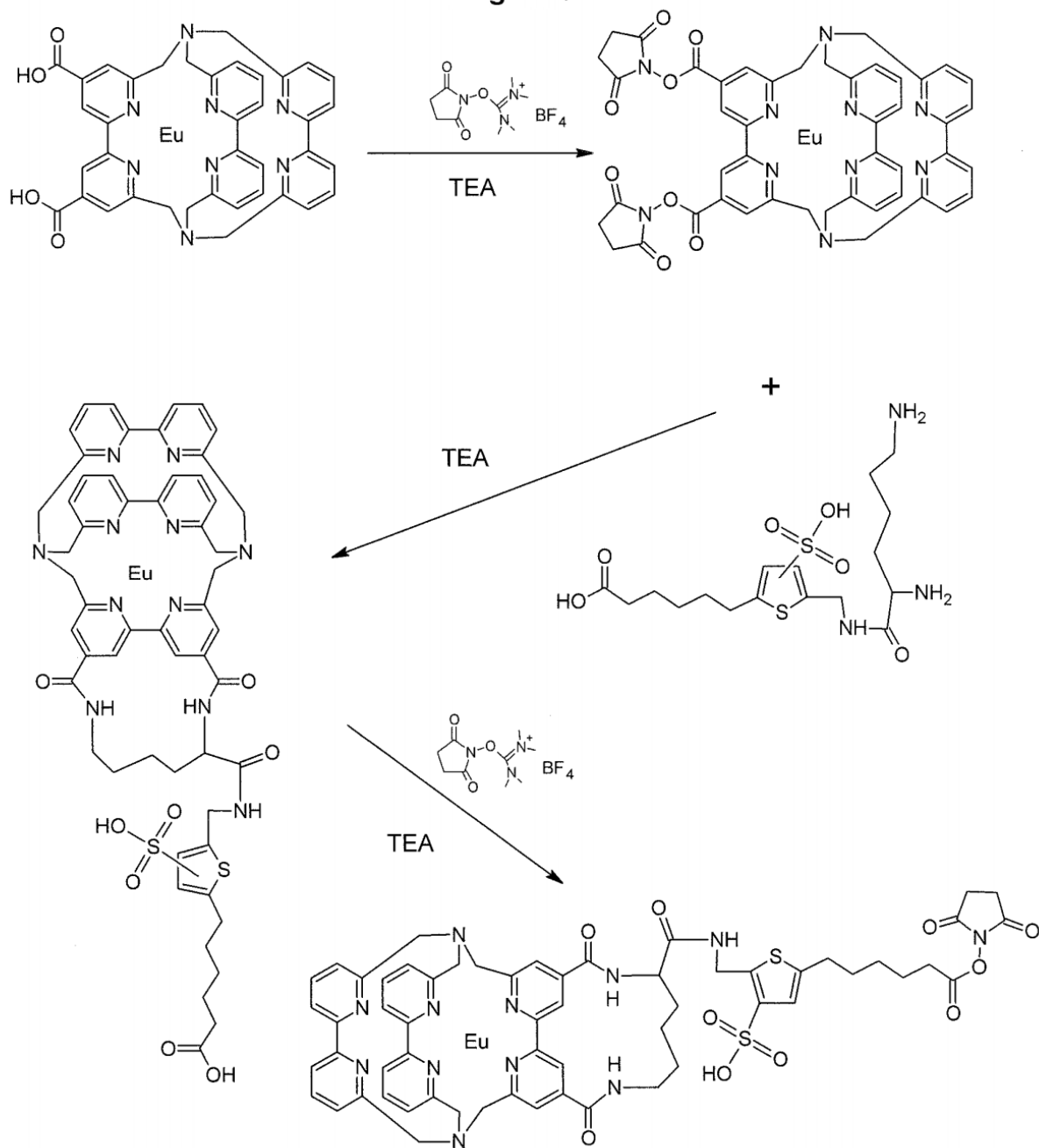


Figura 10

