

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 028**

51 Int. Cl.:

C09B 57/02 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

C07D 409/04 (2006.01)

C07D 409/14 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2017** **E 17159893 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021** **EP 3219712**

54 Título: **Colorantes de cumarina y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

15.03.2016 IT UA20161706

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

03.03.2022

73 Titular/es:

CYANAGEN SRL (100.0%)
Via degli Stradelli Guelfi, 40/C
40138 Bologna, IT

72 Inventor/es:

JANSEN, THOMAS PAUL;
RODEGHIERO, GIACOMO;
FOGLIETTA, DARIO;
PERCIACCANTE, ROSSANA y
DELLA CIANA, LEOPOLDO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 898 028 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 de cumarina y conjugados de los mismos

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a los colorantes de cumarina y conjugados de los mismos.

5 Antecedentes de la invención

Con el desarrollo de los láseres de diodo de alta potencia y la comercialización de una fuente de excitación económicamente viable en el intervalo visible, el láser de diodo de 405 nm ha tenido un gran impacto en el campo de la biotecnología, especialmente en la citometría de flujo, una tecnología biofísica basada en el láser y empleada en el recuento de células, la clasificación de células, la detección de biomarcadores y la ingeniería de proteínas. La necesidad de colorantes adecuados que se ajusten a la fuente de excitación de 405 nm ha inspirado a los investigadores a desarrollar colorantes excitables de longitud de onda corta, que muestren grandes desplazamientos de Stokes y sean adecuados para aplicaciones de bioconjugación.

Son raros los colorantes de cumarina con grandes desplazamientos de Stokes (80 nm o más) y un alto rendimiento cuántico de fluorescencia que se excitan eficazmente con una fuente láser de 405 nm.

15 Diwu *et al.* en la Patente de los Estados Unidos 8.431.416 describen colorantes halogenados de 7-hidroxi cumarina que se pueden utilizar en aplicaciones de citometría de flujo.

La fluorescencia de las 7-hidroxi cumarinas depende del pH debido al valor pKa intrínsecamente alto del protón C7-hidroxilo.

20 La forma protonada o neutra de estos colorantes no es fluorescente. Para que estos colorantes se vuelvan fluorescentes, se requiere la desprotonación completa del protón 7-hidroxilo para dar la forma desprotonada o aniónica. A un pH fisiológico, estos colorantes existen en su forma neutra y no son fluorescentes, por lo que no son útiles en los ensayos biológicos.

25 La incorporación de átomos de cloro en la posición 6 y/o 8 de la estructura del núcleo de la cumarina disminuye el pKa y permite que estos colorantes sean útiles cerca del pH fisiológico. Sin embargo, se observa una fuerte dependencia del pH hasta pH 6 a 6,5 y los átomos de cloro pueden impartir un efecto de átomo pesado con la consiguiente reducción del rendimiento cuántico fluorescente, así como reducir la solubilidad en agua. Además, la forma aniónica de estos colorantes, necesaria para la fluorescencia, puede ser indeseable en algunas aplicaciones, como se describen en Jin *et al.* en ChemBioChem, 2011, 12, 65 a 70.

30 Por el contrario, se sabe que las 7-amino cumarinas son independientes del pH en un intervalo de pH mucho más amplio y muestran una excelente fotoestabilidad y altos rendimientos cuánticos de fluorescencia. Los derivados de aminas primarias tales como los descritos por Haugland *et al.* (US 5.696.157) muestran máximos de absorción cerca del UV (350 nm) y por lo tanto no son adecuados en aplicaciones de citometría de flujo con la fuente de excitación violeta de 405 nm.

35 Las 7-amino cumarinas terciarias, o N-di-alkiladas, son muy conocidas como, por ejemplo, Alexa Fluor 430 entre otras. Sin embargo, la mayoría de estos colorantes no se excitan eficazmente con una fuente láser de 405 nm. Los máximos de excitación típicos se observan en el intervalo de 425 a 450 nm con máximos de emisión entre 460 y 490 nm.

40 La introducción de un sustituyente 3-tienilo en una 7-amino cumarina da un máximo de absorción cerca de 400 nm y un máximo de emisión cerca de 500 nm. En la literatura se han descrito varios otros derivados de 7-amino-3-tienil cumarinas como por ejemplo en EurJOC, 2015(3), 496 a 505 y *Dyes and Pigments*, 112, 227 a 235; 2015. Estos fluoróforos se han utilizado ampliamente, por ejemplo, en la electroluminiscencia y en las células solares sensibilizadas con colorantes.

45 Sin embargo, ninguno de estos colorantes es soluble en agua, son extremadamente hidrofóbicos y no poseen un grupo reactivo necesario para preparar conjugados fluorescentes. Es bien sabido que los fluoróforos hidrofóbicos tienden a mostrar altos niveles de templado cuando se conjugan con un analito.

50 Estos efectos de templado del fluoróforo pueden ser el resultado del auto-templado del colorante o se deben a las interacciones colorante-analito. El autotemplado está causado principalmente por la hidrofobicidad, la proximidad, los altos grados de etiquetado y el tamaño del fluoróforo. El templado debido a las interacciones entre el colorante y el analito también está asociado a la hidrofobicidad del fluoróforo, donde el repliegue del fluoróforo hacia las bolsas hidrofóbicas del analito da lugar a procesos de transferencia de energía entre el colorante y las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos de aminoácidos en las proteínas (por ejemplo, triptófano y tirosina).

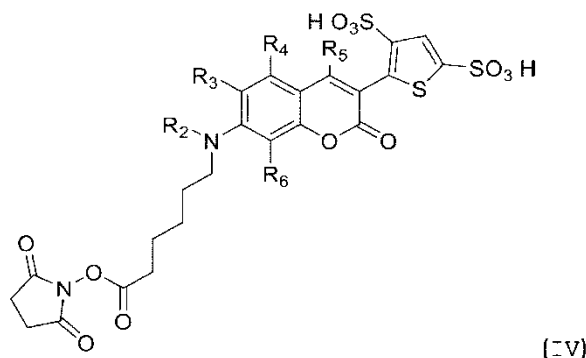
Por lo tanto, estos colorantes no son adecuados como marcadores fluorescentes en aplicaciones de bioconjugación.

Objeto y sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar colorantes de cumarina con fuerte absorción a 405 nm, alta fluorescencia, gran desplazamiento de Stokes, útiles en aplicaciones de bioconjugación.

De acuerdo con la invención, el objeto anterior se consigue gracias a la materia especificada en las reivindicaciones siguientes, que se entienden como parte integrante de la presente descripción.

En una realización, la presente descripción desvela colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina de la fórmula (IV)

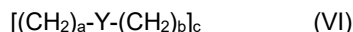


en la que

R2 se selecciona de L-WSG, y alquilo sustituido o no sustituido;

R3, R4, R5, y R6 son H;

L es un enlazador de la fórmula (VI):



en la que

Y es igual o diferente y se selecciona entre ninguno, O, S, NH, NR9, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, CO-S, CO-O-CO, aminotriazina, éter de triazinilo, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-CO-O, O-POR9-O, SO₂, SO₂-O, aminoácido, arilo y heteroarilo,

en el que R9 es alquilo o WSG,

a y c pueden ser iguales o diferentes y son un número entero de 1 a 10, y

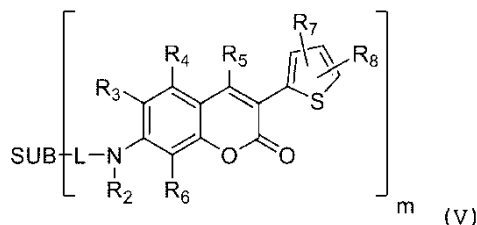
b es un número entero de 0 a 10;

WSG es un grupo soluble en agua y se selecciona entre ácido sulfónico, sulfato, ácido alquilsulfónico, ácido tiosulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, ácido borónico, amonio, piridinio, acridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y -(CH₂-CH₂-O)_x en el que x es un número entero de 1 a 10;

y en el que uno o más sustituyentes, si están presentes, del grupo alquilo se seleccionan entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcóxicarbonilamino, alcóxicarbonilo, hidroxialcoxi, alcóxialcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilamino, ciano, alquilazida, azida, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo y WSG;

y sales de los mismos.

En otra realización, la presente descripción desvela conjugados de colorante de 7-amino-3-tienil cumarina que tienen la fórmula general (V):

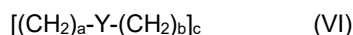


en la que

R2 se selecciona entre L-WSG, y alquilo sustituido o no sustituido;

R3, R4, R5 y R6 son H; R7 y R8 son un ácido sulfónico y están unidos al anillo de tienilo en las posiciones 2 y 4,

L es un enlazador de la fórmula (VI):



en la que

Y es igual o diferente y se selecciona entre ninguno, O, S, NH, NR9, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, CO-S, CO-

O-CO, aminotriazina, éter de triazinilo, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-CO-O, O-POR9-O, SO₂, SO₂-O, aminoácido, arilo y heteroarilo,

en el que R9 es alquilo o WSG,

a y c pueden ser iguales o diferentes y son un número entero de 1 a 10, y

5 b es un número entero de 0 a 10;

WSG es un grupo soluble en agua y se selecciona entre ácido sulfónico, sulfato, ácido alquilsulfónico, ácido tiosulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, ácido borónico, amonio, piridinio, acridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y $-(CH_2-CH_2-O)_x$ en el que x es un número entero de 1 a 10;

m es un número entero de 1 a 25;

10 SUB es un aminoácido, un péptido, una proteína, un sacárido, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un hapteno, un fármaco o un lípido

y en el que uno o más sustituyentes, si están presentes, del grupo alquilo se seleccionan entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxicarbonilamino, alcoxicarbonilo, hidroxialcoxi, alcoxialcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilamino, ciano, alquilazida, azida, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo y WSG;

15 y sales de los mismos.

Los colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina de la fórmula (IV), así como los conjugados relativos de la fórmula (V) muestran grandes desplazamientos de Stokes de al menos 80 nm con excitabilidad eficiente por una fuente de excitación violeta de 405 nm y altas intensidades de fluorescencia en el verde, y son muy adecuados para aplicaciones de bioconjugación.

20 La presente descripción desvela la síntesis y las propiedades de los colorantes de cumarina de 7-amino-3-tienilo de la fórmula (IV) que son útiles para preparar conjugados de colorantes fluorescentes, en particular empleados en, pero no limitados a, aplicaciones de citometría de flujo.

Breve descripción de los dibujos

25 La invención se describirá ahora en detalle, puramente a modo de ejemplo ilustrativo y no limitante y, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- La **figura 1** muestra el esquema general de reacción para la síntesis de los colorantes desvelados en la presente descripción.
- La **figura 2** muestra los espectros de absorción y emisión normalizados del compuesto 6 en tampón de PBS (pH8,5).
- 30 – La **figura 3** muestra una curva de la dependencia del pH de la fluorescencia del compuesto 6.
- La **figura 4** muestra un gráfico de las relaciones entre el colorante y la proteína obtenidas por medio de la conjugación de anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón con un exceso molar creciente del compuesto 7.
- La **figura 5** muestra un gráfico de los datos de fluorescencia obtenidos mediante el uso de conjugados de colorante de anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón conjugados con el compuesto 7 en un intervalo de proporciones de colorante a proteína.
- 35 – Las **figuras 6a y 6b** muestran un gráfico de las relaciones entre el colorante y la proteína obtenidas por medio de la conjugación de anticuerpos de ratón anti-humanos CD4 (figura 6a) y de ratón anti-humanos CD19 (figura 6b) con un exceso molar creciente del compuesto 7.
- 40 – Las **figuras 7a y 7b** muestran un gráfico de los datos de fluorescencia obtenidos mediante el uso de conjugados de colorante de anticuerpos de ratón anti-humanos CD4 (figura 7a) y de ratón anti-humanos CD19 (figura 7b) conjugados con el compuesto 7 en un intervalo de proporciones de colorante a proteína.
- Las **figuras 8a y 8b** muestran los espectros de emisión completos (figura 8a) y el histograma de intensidad de fluorescencia integrado (figura 8b) para un anticuerpo de ratón anti-humano CD19 marcado con el Compuesto 7 y con el Horizon V500 de BD Bioscience a igual concentración de anticuerpo y relación colorante-proteína cuando se excita a 420 nm.
- 45 – Las **figuras 9a y 9b** muestran los espectros de emisión completos (figura 9a) y el histograma de intensidad de fluorescencia integrado (figura 9b) para un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con el compuesto 7 y el compuesto 16 a igual concentración de anticuerpo y proporción de colorante a proteína cuando se excita a 420 nm.
- 50 – La **figura 10** muestra la expresión de CD4 humano en linfocitos de un donante sano en citometría de flujo mediante el uso del conjugado de ratón anti-humano CD4-compuesto 7.
- La **figura 11** muestra la línea de células MAVER-1 teñidas con el conjugado de ratón anti-humano CD19-compuesto 7 (histograma relleno blanco) y sin teñir (histograma relleno gris).

55 Descripción detallada de la invención

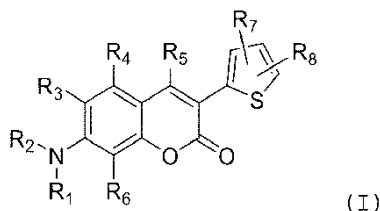
En la siguiente descripción, se presentan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones. Las realizaciones se pueden practicar sin uno o más de los detalles específicos, o con otros procedimientos, componentes, materiales, etc. En otros casos, no se muestran ni se describen en detalle

estructuras, materiales u operaciones muy conocidas para evitar que se oculten aspectos de las realizaciones.

La referencia a lo largo de esta especificación a "una realización" o "la realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización. Por lo tanto, las apariciones de las frases "en una realización" o "en la realización" en varios lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Los títulos que se proporcionan en la presente memoria son sólo por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de las realizaciones.

La presente descripción desvela los colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina de la fórmula (I):



en la que

R1 es L-RG;

R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente entre H, halógeno, alqueno, alquino, ciano, trifluorometilo, arilo, azido, amino, hidroxilo, WSG, L-WSG, alquilo sustituido o no sustituido y alcoxi sustituido o no sustituido; R2 junto con R3 o R6 puede formar un N-heterociclo sustituido o no sustituido de 5 o 6 miembros;

RG es un grupo químicamente reactivo;

L es un enlazador;

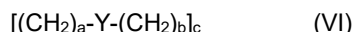
WSG es un grupo soluble en agua;

a condición de que al menos uno de R7 y R8 sea WSG, preferentemente ambos R7 y R8 son WSG;

y sales de los mismos.

RG se selecciona entre: ácido carboxílico, un éster activado de un ácido carboxílico, carbodiimida, haluro de sulfonilo, haluro de acilo, haluro de sililo, azida de acilo, nitrilo de acilo, amina, aldehído, haluro de alquilo o arilo, sulfonato de alquilo éster de sulfonato, anhídrido, azida, aziridina, diazoalcano, haloacetamida, halotriazina, hidracina, hidroxilamina, isocianato, isotiocianato, maleimida, fosforamidato, tiol, hidroxilo, hidracina y alquino. Preferentemente, el RG se selecciona entre un ácido carboxílico, un éster activado de un ácido carboxílico, un haluro de sulfonilo, un haluro de acilo, una amina, un haluro de alquilo o de arilo, un anhídrido, una azida, una haloacetamida, una halotriazina, una hidracina, un isocianato, un isotiocianato, una maleimida, un fosforamidato, un tiol, un hidroxilo y un alquino. Más preferentemente, el RG se selecciona entre un ácido carboxílico, un éster activado de un ácido carboxílico, una amina, una azida, una haloacetamida, una hidracina, un isocianato, una maleimida y un alquino.

L es un enlazador de la fórmula (VI):



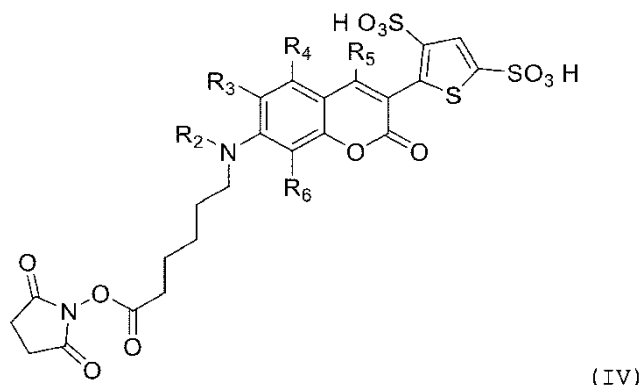
en la que Y puede ser igual o diferente para los distintos sustituyentes y se selecciona entre ninguno, O, S, NH, NR9, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, C=N-NHR9, CO-S, CO-O-CO, aminotriazina, éter de triazinilo, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-CO-O, O-POR9-O, O-Si, SO₂, SO₂-O, aminoácido, arilo o heteroarilo,

en el que R9 es alquilo o WSG,

a y c pueden ser iguales o diferentes y son un número entero de 1 a 10, y

b es un número entero de 0 a 10.

En una realización, la presente descripción se refiere al colorante de 7-amino-3-tienil cumarina que tiene la fórmula (IV):

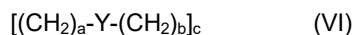


en la que

R2 se selecciona entre L-WSG, y alquilo sustituido o no sustituido;

R3, R4, R5 y R6 son H;

5 L es un enlazador de la fórmula (VI):



en la que

Y es igual o diferente y se selecciona entre ninguno, O, S, NH, NR9, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, CO-S, CO-O-CO, aminotriazina, éter de triazinilo, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-CO-O, O-POR9-O, SO₂, SO₂-O, aminoácido, arilo y heteroarilo,

en el que R9 es alquilo o WSG,

a y c pueden ser iguales o diferentes y son un número entero de 1 a 10, y

b es un número entero de 0 a 10;

WSG es un grupo soluble en agua y se selecciona entre ácido sulfónico, sulfato, ácido alquilsulfónico, ácido tiosulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, ácido borónico, amonio, piridinio, acridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y -(CH₂-CH₂-O)_x en el que x es un número entero de 1 a 10;

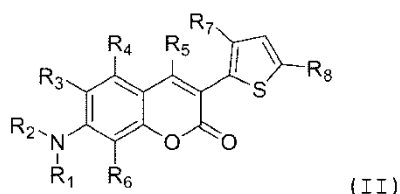
y en el que uno o más sustituyentes, si están presentes, del grupo alquilo se seleccionan entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcóxicarbonilamino, alcóxicarbonilo, hidroxialcoxi, alcóxialcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilamino, ciano, alquilazida, azida, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo y WSG; y sales de los mismos.

En una realización preferida, Y se selecciona entre ninguno, O, S, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O y 1,3-triazol, en el que R9 tiene el significado definido anteriormente.

En una realización, el WSG se selecciona entre ácido sulfónico, ácido alquilsulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, amonio, piridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y -(CH₂-CH₂-O)_x en el que x es un número entero de 1 a 10. Más preferentemente, el WSG se selecciona entre el ácido sulfónico, el ácido alquilsulfónico, la sulfonamida, el amonio y -(CH₂-CH₂-O)_x, en el que x es un número entero de 1 a 10.

En una realización, las sales de ácido sulfónico, de ácido alquilsulfónico, de ácido tiosulfónico, de ácido fosfónico y de ácido borónico se seleccionan entre iones de metales alcalinos y iones de amonio, preferentemente sodio, potasio y un ion de amonio.

La presente descripción además desvela colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina representados por la fórmula (II):



en la que

R1 es L-RG;

R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente entre H, halógeno, ciano, trifluorometilo, hidroxilo, WSG, L-WSG, alquilo sustituido o no sustituido y alcoxi sustituido o no sustituido;

R2 junto con R3 o R6 puede formar un N-heterociclo sustituido o no sustituido de 5 o 6 miembros;

RG es un grupo químicamente reactivo como se ha definido anteriormente;

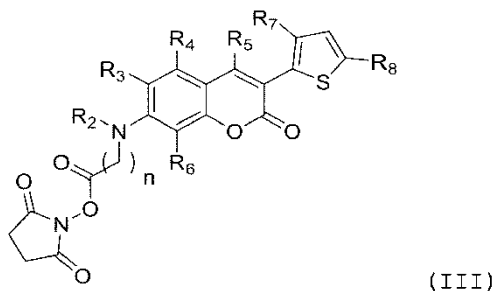
L es un enlazador como se ha definido anteriormente;

WSG es un grupo soluble en agua y se selecciona entre ácido sulfónico, sulfato, ácido alquilsulfónico, ácido

tiosulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, ácido borónico, amonio, piridinio, acridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y polietilenglicol;
a condición de que al menos uno de los R7 y R8 sea un ácido sulfónico, preferentemente ambos R7 y R8 son un ácido sulfónico;

5 y sales de los mismos.

La presente descripción además desvela colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina representados por la fórmula (III):



en la que

R2 se selecciona de entre alquilo sustituido o no sustituido, L-WSG;

10 R3, R4, R5, R6, R7 y R8 se seleccionan independientemente de entre H, halógeno, hidroxilo, ciano, alquilo sustituido o no sustituido y alcoxi sustituido o no sustituido;

R2 junto con R3 o R6 puede formar un N-heterociclo sustituido o no sustituido de 5 o 6 miembros;

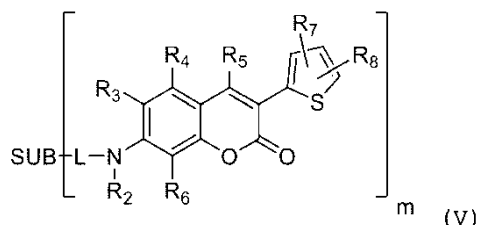
L es un enlazador como se ha definido anteriormente;

WSG es un grupo soluble en agua como se ha definido anteriormente;

15 n es un número entero de 1 a 10;

al menos uno de R7 y R8 es un ácido sulfónico, preferentemente ambos R7 y R8 son un ácido sulfónico;
y sales de los mismos.

En otra realización, la presente descripción desvela conjugados de colorante de 7-amino-3-tienil cumarina que tienen la fórmula general (V):



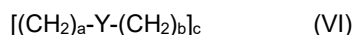
en la que

R2 se selecciona entre L-WSG, y alquilo sustituido o no sustituido;

R3, R4, R5 y R6 son átomos de hidrógeno;

R7 y R8 son un ácido sulfónico y están unidos al anillo de tienilo en las posiciones 2 y 4,

25 L es un enlazador de la fórmula (VI):



en la que Y es igual o diferente y se selecciona entre ninguno, O, S, NH, NR9, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, CO-S, CO-O-CO, aminotriazina, éter de triazinilo, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-CO-O, O-POR9-O, SO₂, SO₂-O, aminoácido, arilo y heteroarilo,

30 en el que R9 es alquilo o WSG,

a y c pueden ser iguales o diferentes y son un número entero de 1 a 10, y

b es un número entero de 0 a 10;

WSG es un grupo soluble en agua y se selecciona entre ácido sulfónico, sulfato, ácido alquilsulfónico, ácido tiosulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, ácido borónico, amonio, piridinio, acridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y -(CH₂-CH₂-O)_x en el que x es un número entero de 1 a 10;

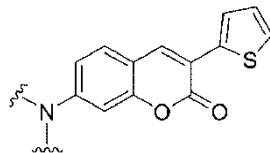
35 m es un número entero de 1 a 25;

SUB es un aminoácido, un péptido, una proteína, un sacárido, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un hapteno, un fármaco o un lípido

y en el que uno o más sustituyentes, si están presentes, del grupo alquilo se seleccionan entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxycarbonilamino, alcoxycarbonilo, hidroxialcoxi, alcoxialcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilamino, ciano, alquilazida, azida, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo y WSG;
y sales de los mismos.

A fin de que la invención en la presente memoria descrita pueda ser comprendida en su totalidad, a continuación se definen explícitamente una serie de términos.

El término "7-amino-3-tienil cumarina", como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier compuesto de colorante que contenga como estructura central la siguiente



Se debe entender que los compuestos de colorante como se desvelan en la presente descripción se pueden dibujar formalmente con otras estructuras de resonancia permitidas.

El término "terciario" o "N-di-alquilado de 7-amino cumarina" significa un compuesto de colorante en el que el grupo 7-amino del colorante cumarina está sustituido dos veces por un átomo de carbono que a su vez está opcionalmente sustituido.

El término "sustituido" se refiere a la sustitución formal de un átomo de hidrógeno en una fracción química o grupo funcional por un radical alternativo. La fracción sustituyente radical alternativa se selecciona entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, aminoalquilo, aminoalcoxi, amino, monoalquilamino, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxycarbonilamino, alcoxycarbonilo, carboxi, hidroxialcoxi, alcoxialcoxi, monoalquilaminoalcoxi, (carboxialquil)amino, alcoxycarbonilo, alquilcarbonilo, alquilsulfonilo, alqueniilsulfonilo, alquinilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilo, carboxialquilamino, ciano, trifluorometoxi, guanidina, alquilazida, azida, alquiltio (disulfuro), acrílo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo o WSG. Preferentemente, la fracción sustituyente radical alternativa se selecciona entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxycarbonilamino, alcoxycarbonilo, hidroxialcoxi, alcoxialcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilamino, ciano, alquilazida, azida, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo o WSG. Más preferentemente, la fracción sustituyente radical alternativa se selecciona entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxialcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, ciano, azida, arilo, heteroarilo o WSG. Aún más preferentemente, la fracción sustituyente radical alternativa se selecciona entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcoxialcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, ciano, azida, arilo o heteroarilo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "alquilo" pretende incluir grupos de hidrocarburos alifáticos saturados ramificados, lineales y cíclicos. Preferentemente, "alquilo" significa un grupo alquilo ramificado, de cadena recta o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono.

Como se utiliza en la presente memoria, "alcoxi" representa un grupo alquilo singularmente unido a un átomo de oxígeno. Preferentemente, "alcoxi" significa un grupo alcoxi ramificado, de cadena recta o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono.

El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo no aromático, lineal, ramificado o cíclico que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Preferentemente, "alqueno" significa un grupo alqueno no aromático, lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono.

El término "alquino" se refiere a un grupo hidrocarburo lineal, ramificado o cíclico, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Preferentemente, "alquino" significa un grupo alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, más preferentemente de 2 a 6 átomos de carbono.

El término "ácido carboxílico" se refiere a un compuesto orgánico que contiene un grupo carboxilo ($\text{C}(=\text{O})\text{OH}$).

El término "arilo" se refiere a cualquier anillo de carbono monocíclico o policíclico estable de hasta 7 átomos en cada anillo en el que al menos un anillo es aromático.

El término "heteroarilo" se refiere a cualquier anillo de carbono monocíclico o policíclico estable de hasta 7 átomos en cada anillo en el que al menos un anillo es aromático y al menos un anillo contiene un heteroátomo en el que el heteroátomo se selecciona entre N, O o S, preferentemente N.

El término "N-heterociclo" significa un anillo saturado o insaturado de 5 o 6 miembros que contiene al menos un átomo de N.

El término "grupo reactivo", o "RG", como se utiliza en la presente memoria, significa un grupo funcional presente en el compuesto de colorante que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional en un compuesto diferente para formar un enlace covalente.

El término "enlazador" o "L", como se utiliza en la presente memoria, significa una fracción química que conecta la estructura central del compuesto de colorante desvelado en la presente descripción con RG o WSG o SUB.

El término "grupo soluble en agua" o "WSG", como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier sustituyente que aumenta la solubilidad en agua de un compuesto de colorante de la presente descripción.

- 5 El término "conjugado de colorante" se refiere a un conjugado entre un compuesto de colorante de la presente invención y un sustrato "SUB".

El término "sustrato" o "SUB", como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier "reactivo de detección" orgánico o inorgánico útil para detectar un analito de interés presente en una muestra a analizar.

- 10 El término "analito", como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier sustancia que deba ser analizada, detectada, medida o etiquetada. Los ejemplos de analitos que se pueden detectar por medio de los colorantes o conjugados de colorantes desvelados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, hormonas, haptenos, antígenos, anticuerpos, receptores, enzimas, ácidos nucleicos, polisacáridos, productos químicos, polímeros, patógenos, toxinas, fármacos orgánicos, fármacos inorgánicos, células, tejidos, microorganismos, virus, bacterias, hongos, algas, parásitos, alérgenos, contaminantes y combinaciones de los mismos.

- 15 Los "reactivos de detección" están representados por cualquier "reactivo específico para el analito" que se une preferentemente al analito de interés y se selecciona generalmente entre los miembros de un par de unión. Cualquiera de los miembros del par se puede utilizar como reactivo específico del analito a fin de unirse selectivamente al otro miembro del par, en el que en algunos casos uno de los miembros del par es el analito a detectar. Los ejemplos de pares de reactivos específicos de analitos incluyen, pero no se limitan a, biotina/avidina, estreptavidina, anticuerpo antibiotina; IgG/proteína; fármaco/receptor de fármacos; toxina/receptor de toxinas; péptido/receptor de péptidos; nucleótido/nucleótido complementario; proteína/receptor de proteínas; sustrato de enzimas/enzima; ácido nucleico/ácido nucleico; hormona/receptor de hormonas; molécula diana/ARN o aptámero de ADN.

- 20 Los compuestos colorantes desvelados en la presente memoria pueden reaccionar a través del residuo RG con una amplia variedad de sustratos "SUB" que contengan o sean modificados para contener grupos funcionales con una reactividad adecuada, lo que da como resultado la unión química del compuesto de colorante al sustrato SUB. Normalmente, la reacción de conjugación entre el colorante y los grupos funcionales del sustrato da lugar a que uno o más átomos del grupo reactivo RG se incorporen a un nuevo enlace que une el colorante al sustrato.

- 25 En la Tabla 1 se muestran ejemplos de grupos reactivos presentes en el colorante o en el SUB, junto con el enlace covalente resultante de su reacción.

Tabla 1

Pares reactivos		Enlace 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
nitrilos de acilo	alcoholes/fenoles	ésteres
nitrilos de acilo	aminas/anilinas	carboxamidas
aldehídos	aminas/anilinas	iminas
aldehídos o cetonas	hidracinas	hidrazonas
haluros de alquilo	aminas/anilinas	aminas de alquilo

Pares reactivos		Enlace Resultante
haluros de alquilo	ácidos carboxílicos	ésteres
haluros de alquilo	tioles	tioéteres
haluros de alquilo	alcoholes/fenoles	éteres
sulfonatos de alquilo	ácidos carboxílicos	ésteres
sulfonatos de alquilo	alcoholes/fenoles	éteres
sulfonatos de alquilo	tioles	tioéteres
anhídridos	alcoholes/fenoles	ésteres
anhídridos	aminas/anilinas	carboxamidas
azida	alquino	1,3 triazol
aziridinas	tioles	tioéteres
carbodiimidas	ácidos carboxílicos	N-acilureas o anhídridos
dialcohalos	ácidos carboxílicos	ésteres
haloacetamidas	tioles	tioéteres
halotriazines	aminas/anilinas	aminotriazinas
halotriazinas	alcoholes/fenoles	éteres de triazinilo
isocianatos	aminas/anilinas	ureas
isocianatos	alcoholes/fenoles	uretanos
isotiocianatos	aminas/anilinas	tioureas
maleimidas	tioles	tioéteres
fosforamiditas	alcoholes	ésteres de fosfito
haluros de sililo	alcoholes	éteres de sililo
ésteres de sulfonato	aminas/anilinas	aminas de alquilo
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

Pares reactivos	Enlace Resultante
*Las acil azidas también se pueden transformar en isocianatos.	

Dentro de la presente descripción, con la expresión "éster activado de un ácido carboxílico" se entiende el éster de un ácido carboxílico que contiene un buen grupo saliente. Los ésteres activados, como se entiende en la técnica, generalmente tienen la fórmula -COW (o -(CO)W), en la que W es un buen grupo saliente, en el que el grupo saliente W se selecciona entre succinimidiloxi (-OC₄H₄O₂) sulfosuccinimidiloxi (-OC₄H₃O₂-SO₃H) -1-oxibenzotriazolilo (-OC₂H₄N₃), un grupo ariloxi o ariloxi sustituido una o más veces por sustituyentes que retiran electrones, tales como nitro, fluoro, cloro ciano, o trifluorometilo, o combinaciones de los mismos, utilizados 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), en el que Alk1 y Alk2, que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan entre alquilo C₁-C₂₀, perfluoroalquilo C₁-C₂₀, alcoxi C₁-C₂₀, ciclohexilo, 3-dimetilaminopropilo y N-morfolinoetilo.

Cuando RG es un éster activado de un ácido carboxílico, el colorante de la fórmula (I) es particularmente útil para preparar conjugados de colorante de proteínas, nucleótidos, oligonucleótidos o haptenos.

Cuando RG es una maleimida o haloacetamida, el colorante reactivo es particularmente útil para la conjugación con el sustrato que contiene tiol.

Cuando RG es una hidrazida, el colorante de la fórmula (I) es particularmente útil para la conjugación con carbohidratos y glicoproteínas oxidadas por periodatos y, además, es un trazador polar fijable por aldehídos para la microinyección celular.

Cuando RG es una azida, el colorante de la fórmula (I) es particularmente útil para la conjugación con sustratos que contienen alquinos por medio de una reacción de cicloadición 1,3-dipolar catalizada por Cu(I).

En otra realización, la presente descripción se refiere a kits que facilitan la práctica de diversos ensayos mediante el uso de cualquiera de los colorantes desvelados en la presente memoria. Los kits comprenden típicamente un colorante fluorescente de la fórmula (I) o un conjugado de colorante de la fórmula (V) en forma seca o de solución junto con al menos un componente más. El otro componente del kit se selecciona entre un agente amortiguador tal como el tampón de etiquetado, el tampón de funcionamiento y el tampón de lavado, un reactivo de detección adicional tal como un colorante fluorescente o un conjugado de colorante diferente al colorante o al conjugado de colorante descrito en la presente memoria que puede ser útil en ensayos multianálisis, una columna de purificación que puede ser útil para purificar la sustancia marcada resultante y un disolvente orgánico para disolver el colorante fluorescente si está presente en forma seca.

Los colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina de la fórmula (I) se caracterizan por un máximo de absorción a 410 nm ± 10 nm con un gran desplazamiento de Stokes de al menos 80 nm y un máximo de emisión a 510 nm ± 10 nm en el verde.

Los colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina de la presente invención son independientes del pH en un amplio intervalo de pH como se muestra, por ejemplo, en la fig. 3 para el compuesto 6. Este aspecto ofrece una ventaja sobre las 7-hidroxicumarinas que son dependientes del pH debido a los altos valores de pKa del grupo hidroxilo y son poco fluorescentes a pH fisiológico.

Los colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina, que a su vez están sustituidos dos veces por WSG en el anillo de tienilo, proporcionan un colorante con un máximo de absorción cerca de 405 nm y un máximo de emisión cerca de 500 nm.

El máximo de absorción a 410 ± 10 nm proporciona un colorante que es útil para aplicaciones en las que un conjugado de colorante puede ser detectado con alta sensibilidad después de la excitación con una fuente de excitación violeta de 405 nm.

La introducción de al menos un grupo soluble en agua en la fracción de tienilo aumenta la hidrofilia del colorante, para mantener las propiedades espectroscópicas óptimas. Además, el posicionamiento de los grupos solubles en agua en el anillo de tienilo disminuye sustancialmente los efectos de templado debidos a las interacciones colorante-colorante o colorante-sustrato durante la conjugación, lo que da lugar a una mayor fluorescencia total del conjugado de colorante en comparación con el correspondiente colorante de 7-amino-3-tienil cumarina, que no está sustituido en el anillo de tienilo, como se muestra en las figuras 9a y 9b. Los grupos solubles en agua particularmente preferidos presentes en la fracción de tienilo son el ácido sulfónico y sales de los mismos. El ácido sulfónico o sales de los mismos proporcionan, de hecho, un colorante fluorescente con óptima solubilidad en agua, bajo peso molecular, excelente rendimiento de conjugación y conjugados altamente fluorescentes.

El gran desplazamiento de Stokes proporciona un colorante, después de la conjugación con un sustrato, que es extremadamente útil para aplicaciones multiplex en ensayos biológicos, que utilizan la fuente de excitación violeta de

405 nm. La separación espectral de varios fluoróforos en distintos canales de excitación o adquisición es esencial para la detección múltiple de analitos.

Los colorantes de 7-amino-3-tienil cumarina de la fórmula (I) preferidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Colorante	Estructura
5-(7-((5-carboxipentilo)(etilo)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio (compuesto 6)	
5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio (compuesto 7)	
5-(7-(etil(6-hidrazinil-6-oxohexil)amino)-2-oxo-2H-cromo-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio (compuesto 8)	
5-(7-((6-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)amino)-6-oxohexil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio (compuesto 9)	
5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)(3-sulfonatopropil)amino)-2-oxo-2H-cromo-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio (compuesto 15)	

Colorante	Estructura
5-(9-(6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-piran[3,2-g]quinolin-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio (compuesto 22)	
Ácido 5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)(2-(2-metoxietoxi)etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico	
Ácido 5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)(2-oxo-2-((3-sulfoetil)amino)etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico	
Ácido 5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)(3-(N-(2-sulfoetil)sulfamoil)propil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico	
Ácido 5-(7-((N-(6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)sulfamoil)propil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico	

Colorante	Estructura
Ácido 5-(7-((4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)carbonil)bencilo)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico	
2,5-dioxopirrolidina-1-il 6-((3-(3,5-disulfamoiiltiofen-2-il)-2-oxo-2H-cromo-7-il) (etil)amino)hexanoato	

El número de los colorantes en la tabla 2 corresponde a la numeración de los compuestos descritos en los ejemplos.

Ejemplos

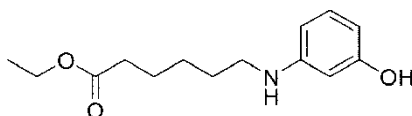
En los siguientes ejemplos, se proporciona la síntesis de los colorantes seleccionados, la síntesis de los conjugados seleccionados, su caracterización y los procedimientos de uso. Otras modificaciones y permutaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los ejemplos ilustran la práctica de la invención y no pretenden limitar o definir todo el alcance de la invención.

Los compuestos colorantes desvelados en la presente memoria se sintetizan de acuerdo con el esquema general de síntesis mostrado en la figura 1. La síntesis de los compuestos tintóreos de la presente descripción se consigue por medio de la aminoalquilación de fenoles 3-amino, seguida por una formilación Vilsmeier para proporcionar el derivado intermedio salicilaldehído. A continuación, una condensación mediada por anhídrido acético con ácido tiofeno acético da la estructura del núcleo del colorante. La funcionalización final proporciona el colorante químicamente reactivo requerido para la bioconjugación para proporcionar conjugados de colorantes fluorescentes de acuerdo con la presente descripción.

Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden utilizar otras rutas sintéticas para sintetizar los colorantes de la invención. Aunque los materiales de partida y los reactivos específicos se discuten a continuación, otros materiales de partida y reactivos pueden ser fácilmente sustituidos para proporcionar una variedad de derivados y/o condiciones de reacción. Además, muchos de los colorantes preparados por los procedimientos descritos a continuación se pueden modificar aún más a la luz de esta divulgación mediante el uso de la química convencional muy conocida por los expertos en la técnica. En los ejemplos se describe con más detalle cada una de las etapas de reacción.

Ejemplo 1.

6-((3-hidroxifenil)amino)hexanoato de etilo, Compuesto 1

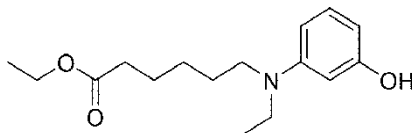


En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 100 mL preparado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se disolvió 3-aminofenol (40,0 g, 367 mmol) en DMF. Se añadió hexanoato de etilo-6-bromo (16,4 g, 73 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 20 hs. El disolvente se eliminó al vacío para dar un aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 1, como un aceite incoloro. El rendimiento fue de 13,7 g (74%, basado en hexanoato de etilo-6-bromo).

Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) δ 7,00 (t, 1H, J = 8,2Hz), 6,17 (m, 2H), 6,09 (t, 1H, J = 2,3Hz), 4,13 (q, 2H, J = 7,4Hz), 3,08 (t, 2H, J = 7,0Hz), 2,30 (t, 2H, J = 7,4Hz), 1,71 a 1,58 (m, 4H), 1,46 a 1,38 (m, 2H), 1,26 (t, 3H, J = 7,0Hz).

Ejemplo 2

5 6-(etil(3-hidroxifenil)amino)hexanoato de etilo, Compuesto 2

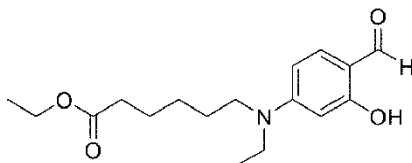


En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 100 mL, preparado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se disolvió el compuesto 1 (5,3 g, 21,1 mmol) en DMF. Se añadieron yoduro de etilo (3,29 g, 21,1 mmol) y carbonato de potasio (2,92 g, 21,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 20 hs. El disolvente se eliminó al vacío para dar un aceite crudo. El aceite crudo se disolvió en acetato de etilo (250 mL) y se extrajo con HCl acuoso (0,05 M, 2 x 200 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se eliminó al vacío para dar un aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 2, como un aceite incoloro. El rendimiento fue de 5,1 g (86%).

15 Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) δ 7,04 (t, 1H, J = 8,2Hz), 6,23 (d, 1H, J = 8,2Hz), 6,16 (s, 1H), 6,12 (d, 1H, J = 7,6Hz), 5,13 (banda ancha, 1H), 4,14 (q, 2H, J = 7,0Hz), 3,31 (q, 2H, J = 7,0Hz), 3,21 (t, 2H, J = 7,6Hz), 2,32 (t, 2H, J = 7,0Hz), 1,70 a 1,66 (m, 2H), 1,62 a 1,57 (m, 2H), 1,38 a 1,33 (m, 2H), 1,26 (t, 3H, J = 7,0Hz), 1,13 (t, 3H, J = 7,0Hz).

Ejemplo 3

6-(etil(4-formil-3-hidroxifenil)amino)hexanoato de etilo, Compuesto 3

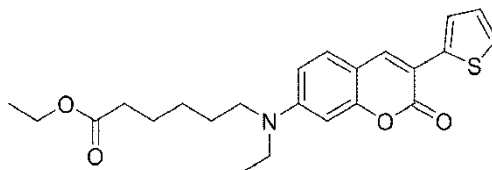


20 Un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, de 100 mL equipado con una barra de agitación se enfrió a 0 °C. Se añadió DMF anhidra (14,5 mL, 188 mmol), seguido por la adición lenta de POCl_3 (8,7 mL, 94 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. y otros 30 min. a temperatura ambiente. Se añadió lentamente una solución del compuesto 2 (3,5 g, 12,5 mmol) en DMF (anh, 10 mL) a temperatura ambiente (RT) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 20 hs. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se apagó por medio de la adición de pequeños trozos de hielo cada vez. El pH se neutralizó a un pH de 8 a 10 con NaOH 1M. La solución acuosa se extrajo con DCM (2 x 250 mL). El disolvente se eliminó al vacío para dar un aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 3, como un aceite incoloro. El rendimiento fue de 2,0 g (53%).

30 Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) pureza > 98%. δ 11,62 (s, 1H), 9,48 (s, 1H), 7,25 (d, 1H, J=8,8), 6,23 (dd, 1H, J=8,8, 2,3), 6,04 (d, 1H, J=2,3), 4,13 (q, 2H, J=7,0), 3,40 (q, 2H, J=7,0), 3,30 (t, 2H, J=7,6), 2,31 (t, 2H, J=7,6), 1,70 a 1,60 (m, 4H), 1,37 (m, 2H), 1,25 (t, 3H, J=7,6), 1,19 (t, 3H, J=7,0).

Ejemplo 4

6-(etil(2-oxo-3-(tiofen-2-il)-2H-cromo-7-il)amino)hexanoato de etilo, Compuesto 4



35 En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 100 mL, preparado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se disolvió el ácido 2-tiofeno acético (0,53 g, 3,69 mmol) en anhídrido acético. La solución resultante se agitó a 60 °C durante 15 a 20 min. Se añadió el compuesto 3 (1,70 g, 5,53 mmol) seguido por trietilamina (0,73 mL, 7,38 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 3 hs. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en agua fría. El líquido se decantó y el aceite crudo se disolvió en DCM (100 mL).

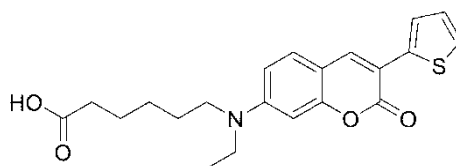
40

La fase orgánica se lavó con agua (2 x 100 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se eliminó el disolvente al vacío para dar un aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 4, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 0,54 g (35%).

- 5 Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) pureza > 98%. δ 7,88 (s, 1H), 7,66 (dd, 1H, J = 3,5, 1,2), 7,31 (d, 1H, J = 8,6), 7,31 (dd, 1H, J = 1,2), 7,08 (dd, 1H, J = 5,1, 3,5), 6,59 (dd, 1H, J = 8,9, 2,3), 6,50 (d, 1H, J = 2,3), 4,13 (cuarteto, 2H, J = 7,4), 3,43 (cuarteto, 2H, J = 7,0), 3,32 (t, 2H, J = 7,8), 2,33 (t, 2H, J = 7,4), 1,73 a 1,61, m, 4H), 1,43 a 1,36 (m, 2H), 1,26 (t, 3H, J = 7,4), 1,21 (t, 3H, J = 7,0).

Ejemplo 5

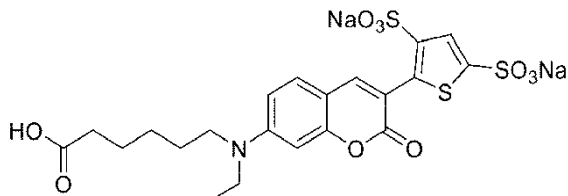
10 Ácido 6-(etil(2-oxo-3-(tiofen-2-il)-2H-cromo-7-il)amino) hexanoico, Compuesto 5



- En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 10 mL, preparado con una barra de agitación magnética, se disolvió el compuesto 4 (500 mg, 1,21 mmol) en tetrahidrofurano (10 mL). Se disolvió hidróxido de sodio (242 mg, 6,05 mmol) en agua (10 mL) y se añadieron las soluciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 hs.
- 15 El tetrahidrofurano se eliminó al vacío y la fase acuosa se neutralizó con ácido clorhídrico acuoso (0,1M) hasta alcanzar un pH de 7. La fase acuosa se extrajo entonces con diclorometano (2 x 50 mL), las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y el disolvente se eliminó al vacío para dar el aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 5, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 140 mg (32%).
- 20 Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) pureza (>95%). δ 7,88 (s, 1H), 7,65 (dd, 1H, J = 3,5, 1,2), 7,31 (d, 1H, J = 8,6), 7,30 (dd, 1H, J = 5,5, 1,2), 7,08 (dd, 1H, J = 5,1, 3,5), 6,59 (dd, 1H, J = 8,9, 2,3), 6,51 (d, 1H, J = 2,3), 3,43 (cuarteto, 2H, J = 7,0), 3,34 (t, 2H, J = 7,8), 2,40 (t, 2H, J = 7,4), 1,75 a 1,63 (m, 4H), 1,46 a 1,39 (m, 2H), 1,21 (t, 3H, J = 7,0).

Ejemplo 6

5-(7-((5-carboxipentil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio, Compuesto 6



- En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y entrada de argón, se disolvió el compuesto 5 (90 mg, 0,23 mmol) en DMF anhidra (5 mL). Se añadió el complejo de trióxido de azufre y dimetilformamida (1,49 g, 9,34 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 20 hs bajo una atmósfera inerte de Argón. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó por medio de la adición de NaHCO_3 (saturado, 5 mL). Los disolventes se eliminaron al vacío para dar el aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna C18 de fase inversa con un gradiente de agua/metanol como eluyente para obtener el producto deseado, como un aceite naranja oscuro. El aceite naranja oscuro obtenido se hizo pasar por una columna Sephadex LH20 con un gradiente isocrático de agua como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 6, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 70 mg (55%).
- 30 Análisis: RMN de ^1H (D_2O , 600 MHz) pureza (>95%). δ 8,78 (s, 1H), 7,34 (d, 1H, J = 8,8), 7,21 (s, 1H), 6,71 (dd, 1H, J = 8,4, 2,3), 6,52 (d, 1H, J = 2,3), 3,45 (cuarteto, 2H, J = 7,0), 3,34 (t, 2H, J = 7,4), 1,89 (t, 1H, J = 7,0), 1,58 a 1,52 (m, 2H), 1,52 a 1,47 (m, 2H), 1,33 a 1,28 (m, 2H), 1,13 (t, 3H, J = 7,0).

Abs máx. = 412 nm, Em máx. = 507 nm

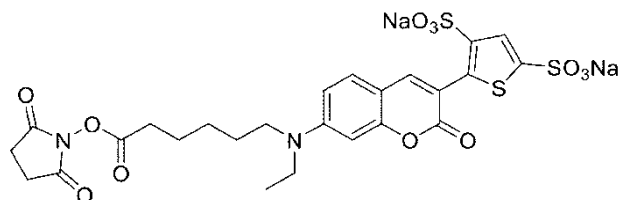
Coef. ext. mol. = 26000 a 27000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

- 40 QY = 0,70 a 0,75

Ejemplo 7

5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de

sodio, Compuesto 7

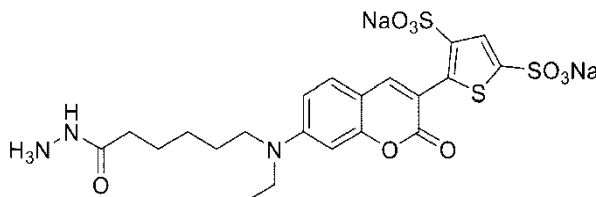


En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y una entrada de argón, se disolvió el compuesto 6 (115 mg, 0,20 mmol) en DMF anhidra (5 mL). Se añadió TSTU (65 mg, 0,22 mmol) y DMAP (26 mg, 0,22 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a éter dietílico (100 mL) bajo agitación. El precipitado naranja oscuro resultante se recogió por medio de filtración y se lavó con éter dietílico (5 mL) y diclorometano (5 mL). El sólido naranja oscuro se tomó en una cantidad mínima de dimetilformamida anhidra, se transfirió a un matraz de fondo redondo de 10 mL y se concentró al vacío para obtener el producto deseado, el compuesto 7, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 120 mg (95%).

Análisis: RMN de ^1H (d_6 -DMSO, 600 MHz) pureza (>95%). El espectro se amplía δ 8,74 (s, 1H), 7,33 (d, 1H, $J = 8,8$), 7,21 (s, 1H), 6,71 (d, 1H, $J = 7,6$), 6,50 (s, 1H), 3,44 (cuarteto, 2H, $J = 7,0$), 3,34 (t, 2H, $J = 8,2$), 2,71 (s, 4H), 2,67 (t, 2H, $J = 7,0$), 1,67 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,41 (m, 2H), 1,11 (t, 3H, $J = 7,0$).

Ejemplo 8

5-(7-(etil(6-hidrazinil-6-oxohexil)amino)-2-oxo-2H-cromo-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio, Compuesto 8

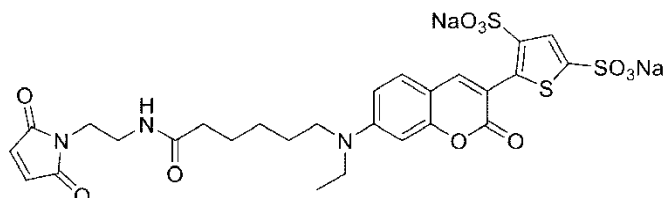


En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y una entrada de argón, se disolvió el compuesto 7 (115 mg, 0,20 mmol) en DMF anhidra (0,55 mL). Se añadió una solución de hidracina anhidra (125 μL , 4 mmol) en DMF (0,5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a acetato de etilo (100 mL) bajo agitación. El precipitado naranja oscuro resultante se recogió por medio de filtración y se lavó con éter dietílico (5 mL) y diclorometano (5 mL). El sólido naranja oscuro se tomó en una cantidad mínima de dimetilformamida anhidra, se transfirió a un matraz de fondo redondo de 10 mL y se concentró al vacío para obtener el producto deseado, el compuesto 8, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 115 mg (91%).

Análisis: RMN de ^1H (d_6 -DMSO, 600 MHz) pureza (>95%). El espectro se amplía δ 8,87 (s, 1H), 7,33 (d, 1H, $J = 8,8$), 7,18 (s, 1H), 6,68 (d, 1H, $J = 7,6$), 6,50 (s, 1H), 4,14 (bs, 2H), 3,44 (cuarteto, 2H, $J = 7,0$), 3,34 (t, 2H, $J = 8,2$), 2,19 (t, 2H, $J = 7,0$), 1,67 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,41 (m, 2H), 1,11 (t, 3H, $J = 7,0$).

Ejemplo 9

5-(7-((6-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)amino)-6-oxohexil)tiofen-2,4-disulfonato de sodio, Compuesto 9



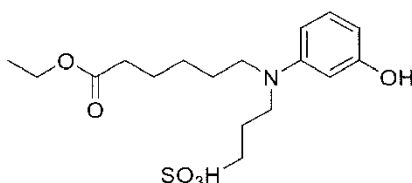
En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y una entrada de argón, se disolvió el compuesto 7 (115 mg, 0,20 mmol) en DMF anhidra (2 mL). Se añadió la sal de trifluoroacetato de N-(2-Aminoetil)maleimida y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a acetato de etilo (100 mL) bajo agitación. El precipitado naranja oscuro resultante se recogió por medio de filtración y se lavó con éter dietílico (5 mL) y diclorometano (5 mL). El sólido naranja oscuro se tomó en una cantidad mínima de dimetilformamida anhidra, se transfirió a un matraz de fondo redondo de 10 mL y se concentró al vacío para obtener el producto deseado, el compuesto 9, como un sólido naranja oscuro. El

rendimiento fue de 115 mg (91%).

Análisis: RMN de ^1H ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, 600 MHz) pureza (>95%). El espectro se amplía δ 8,87 (s, 1H), 7,86 (d, 2H, $J=10,9$), 7,33 (d, 1H, $J=8,8$), 7,18 (s, 1H), 6,68 (d, 1H, $J=7,6$), 6,50 (s, 1H), 3,66 (m, 2H), 3,44 (cuarteto, 2H, $J=7,0$), 3,34 (t, 2H, $J=8,2$), 2,19 (t, 2H, $J=7,0$), 1,67 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,41 (m, 2H), 1,11 (t, 3H, $J=7,0$).

5 Ejemplo 10

Ácido 3-((6-etoxi-6-oxohexil) (3-hidroxifenil)amino)propano-1-sulfónico, Compuesto 10

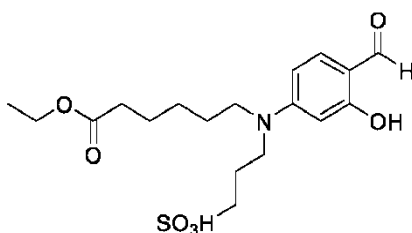


En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 100 mL, preparado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se añadió el compuesto 1 (2,85 g, 11,4 mmol) y 1,3-Propano Sultona (2,77 g, 22,69 mmol) bajo Argón. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C hasta el día siguiente. El aceite crudo obtenido se purificó en una columna C18 de fase inversa con un gradiente de Agua/Metanol como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 10, como un aceite incoloro. El rendimiento fue de 1,5 g ($r=33\%$).

Análisis: RMN de ^1H (D_2O , 600 MHz) pureza > 98%. δ 7,34 (t, 1H, $J=8,2$), 6,92 (d, 1H, $J=1,9$), 6,90 (d, 1H, $J=2,4$), 6,90 (d, 1H, $J=2,4$), 3,96 (q, 2H, $J=7,0$), 3,59 (t, 2H, $J=7,8$), 3,44 (t, 2H, $J=7,8$), 2,75 (t, 2H, $J=7,4$), 2,15 (t, 2H, $J=7,4$), 1,81 (m, 2H), 1,43 a 1,23 (m, 4H), 1,15 (m, 2H), 1,07 (t, 3H, $J=7,4$).

Ejemplo 11

Ácido 3-((6-etoxi-6-oxohexil) (4-formil-3-hidroxifenil)amino)propano-1-sulfónico, Compuesto 11

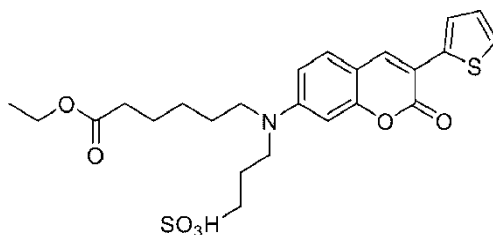


Un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, de 100 mL equipado con una barra de agitación se enfrió a 0 °C. Se añadió DMF anhidra (2 mL, 25,29 mmol), seguido por la adición lenta de POCl_3 (1,17 mL, 12,65 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y otros 30 min a temperatura ambiente. Se añadió lentamente una solución del compuesto 10 (1,0 g, 2,53 mmol) en DMF (anh, 5 mL) a temperatura ambiente (RT) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 20 hs. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se apagó por medio de la adición de pequeños trozos de hielo cada vez. El pH se neutralizó a un pH de 8 a 10 con NaOH 1M. La solución acuosa se extrajo con DCM (2 x 250 mL). El disolvente se eliminó al vacío para dar un aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna C18 de fase inversa con un gradiente de Agua/Metanol como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 11, como un aceite incoloro. El rendimiento fue de 500 mg (47%).

Análisis: RMN de ^1H (D_2O , 600 MHz) pureza > 98%. δ 9,29 (s, 1H), 7,32 (d, 1H, $J=9,37$), 6,30 (d, 1H, $J=9,37$), 5,96 (s, 1H), 3,99 (q, 2H, $J=7,4$), 3,41 (t, 2H, $J=7,4$), 3,29 (t, $J=7,4$), 2,81 (t, 2H, $J=7,4$), 2,23 (t, 2H, $J=7,4$), 1,92 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,21 (m, 2H), 1,08 (t, 3H, $J=7,4$).

Ejemplo 12

Ácido 3-((6-etoxi-6-oxohexilo) (2-oxo-3-(tiofen-2-il)-2H-cromo-7-il)amino)propano-1-sulfónico, Compuesto 12

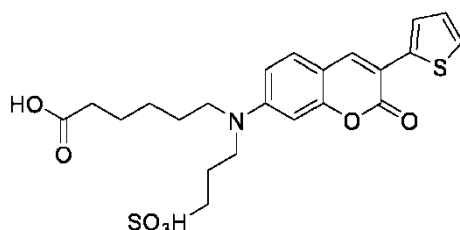


En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 100 mL, preparado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se disolvió ácido 2-tiofeno acético (167 mg, 1,18 mmol) en anhídrido acético. La solución resultante se agitó a 60 °C durante 15 a 20 min. Se añadió el compuesto 11 (500 mg, 1,18 mmol) seguido por trietilamina (0,31 mL, 2,24 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 3 hs. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se precipitó en Éter de Petróleo. El aceite oscuro se decantó y se purificó en una columna C18 con un gradiente de H₂O/MeOH como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 12, como un sólido amarillento. El rendimiento fue de 0,25 g (35%).

Análisis: RMN de ¹H (D₂O, 400 MHz) pureza > 98%. δ 7,53 (s, 1H), 7,34 (d, 1H, J=2,2), 7,22 (s, 1H), 6,83 a 6,75 (m, 2H), 6,24 (d, 1H, J=8,6), 6,18 (s, 1H), 4,03 (q, 2H, J=7,0), 3,30 (bs, 2H), 2,96 (bs, 2H) 2,87 (t, 2H, J=8,6), 2,15 (t, 2H, J=7,0) 1,98 (m, 2H), 1,40 (m, 2H), 1,15 (t, 2H, J=7,4), 0,9 (bs, 2H).

Ejemplo 13

Ácido 6-((2-oxo-3-(tiofen-2-il)-2H-cromo-7-il) (3-sulfopropil)amino) hexanoico, Compuesto 13

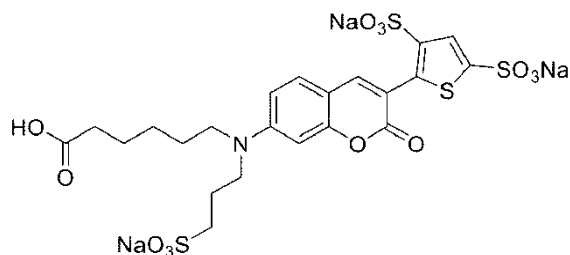


En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 10 mL, preparado con una barra de agitación magnética, se disolvió el compuesto 12 (0,23 g, 0,43 mmol) en tetrahidrofurano (5 mL). Se disolvió hidróxido de sodio (86 mg, 2,17 mmol) en agua (5 mL) y se añadieron las soluciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 hs. El tetrahidrofurano se eliminó al vacío y la fase acuosa se neutralizó con ácido clorhídrico acuoso (0,1M) hasta alcanzar un pH de 7. El aceite crudo se purificó en una columna C18 con un gradiente de H₂O/MeOH como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 13, como un sólido amarillento. El rendimiento fue de 130 mg (60%).

Análisis: RMN de ¹H (D₂O, 400 MHz) pureza > 98%. δ 7,87 (s, 1H), 7,47 (d, 1H, J=2,7), 7,45 (d, 1H, J=5,7), 7,25 (d, 1H, J=8,6), 7,15 (t, 1H, J=3,5), 6,62 (d, 1H, J=9,37), 6,37 (s, 1H), 3,38 (t, 2H, J=7,8), 3,26-3,15 (m, 2H), 2,94 (t, 2H, J=7,8), 2,23 (m, 2H, J=7,4), 2,02 (m, 2H), 1,64 a 1,50 (m, 4H), 1,34 (m, 2H).

Ejemplo 14

5-(7-((5-carboxipentil)(3-sulfonatopropil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio, Compuesto 14



En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y entrada de argón, se disolvió el compuesto 13 (127 mg, 0,25 mmol) en DMF anhidra (5 mL). Se añadió el complejo de trióxido de azufre y dimetilformamida (1,55 g, 10 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 20 hs bajo una atmósfera inerte de Argón. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó por medio de la adición de NaHCO₃ (saturado, 5 mL). Los disolventes se eliminaron al vacío para dar el aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna C18 de fase inversa con un gradiente de agua/metanol como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 14, como un sólido amarillento. El producto obtenido se hizo pasar por una columna Sephadex LH20 (3x40 cm, eluyente H₂O) con un gradiente isocrático de agua como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 14, como un sólido amarillento. El rendimiento fue de 75 mg (42%).

Análisis: RMN de ¹H (D₂O, 400 MHz) pureza > 98%. δ 8,07 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,41 (d, 1H, J=8,9), 6,76 (d, 1H, J=8,6), 6,62 (s, 1H), 3,49 (t, 2H, J=7,8), 3,36 (t, 2H, J=7,4), 2,86 (t, 2H, J=7,6), 2,07 (t, 2H, J=7,4), 1,97 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,25 (m, 2H).

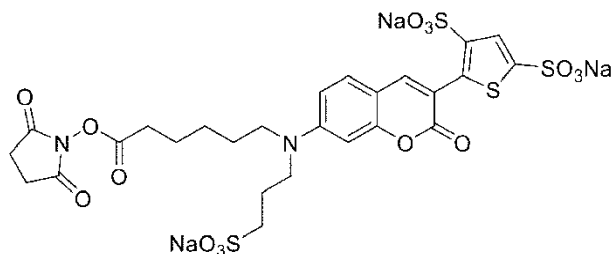
Abs máx. = 414 nm, Em máx. = 507 nm

Coef. ext. mol. = 26000 a 27000 M⁻¹cm⁻¹

QY = 0,70 a 0,75

Ejemplo 15

5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)(3-sulfonatopropil)amino)-2-oxo-2H-cromo-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio, Compuesto 15



5

En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y entrada de argón, se disolvió el compuesto 14 (141 mg, 0,20 mmol) en DMF anhidra (5 mL). Se añadió TSTU (65 mg, 0,22 mmol) y DMAP (26 mg, 0,22 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a éter dietílico (100 mL) bajo agitación. El precipitado naranja oscuro resultante se recogió por medio de filtración y se lavó con éter dietílico (5 mL) y diclorometano (5 mL). El sólido naranja oscuro se tomó en una cantidad mínima de dimetilformamida anhidra, se transfirió a un matraz de fondo redondo de 10 mL y se concentró al vacío para obtener el producto deseado, el compuesto 15, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 143 mg (90%).

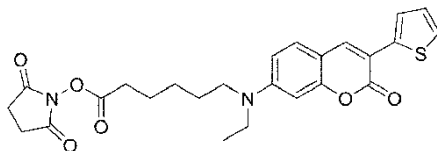
10

Análisis: RMN de ^1H ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, 600 MHz) pureza (>95%). El espectro se amplía δ 8,07 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,41 (d, 1H, J=8,9), 6,76 (d, 1H, J=8,6), 6,62 (s, 1H), 3,49 (t, 2H, J=7,8), 3,36 (t, 2H, J=7,4), 2,86 (t, 2H, J=7,6), 2,71 (s, 4H), 2,67 (t, 2H, J=7,0), 1,97 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,25 (m, 2H).

15

Ejemplo 16

2,5-dioxopirrolidina-1-il 6-(etil(2-oxo-3-(tiofen-2-il)-2H-cromo-7-il)aminoato, Compuesto 16



En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y entrada de argón, se disolvió el compuesto 5 (77 mg, 0,20 mmol) en DMF anhidra (5 mL). Se añadió TSTU (65 mg, 0,22 mmol) y DMAP (26 mg, 0,22 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a ciclohexano (100 mL) bajo agitación. El precipitado naranja oscuro resultante se recogió por medio de filtración y se lavó con ciclohexano (5 mL). El sólido naranja oscuro se tomó en una cantidad mínima de dimetilformamida anhidra, se transfirió a un matraz de fondo redondo de 10 mL y se concentró al vacío para obtener el producto deseado, el compuesto 16, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 78 mg (90%).

20

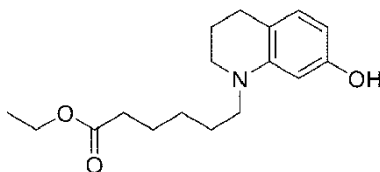
25

Análisis: RMN de ^1H ($\text{d}_6\text{-DMSO}$, 600 MHz) δ 7,88 (s, 1H), 7,65 (dd, 1H, J=3,5, 1,2), 7,31 (d, 1H, J=8,6), 7,30 (dd, 1H, J=5,5, 1,2), 7,08 (dd, 1H, J=5,1, 3,5), 6,59 (dd, 1H, J=8,9, 2,3), 6,51 (d, 1H, J=2,3), 3,43 (cuarteto, 2H, J=7,0), 3,34 (t, 2H, J=7,8), 2,71 (s, 4H), 2,67 (t, 2H, J=7,0 Hz), 1,75 a 1,63 (m, 4H), 1,46 a 1,39 (m, 2H), 1,21 (t, 3H, J=7,0).

30

Ejemplo 17

6-(7-hidroxi-3,4-dihidroquinolina-1(2H)-il)hexanoato de etilo, Compuesto 17



En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 100 mL, preparado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se disolvió 7-hidroxi-3,4-dihidroquinolina (10,0 g, 67,03 mmol) en DMF. Se añadió etil-6-yodohexanoato (17,9 g, 80 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 20 hs. El disolvente se eliminó al vacío para dar un

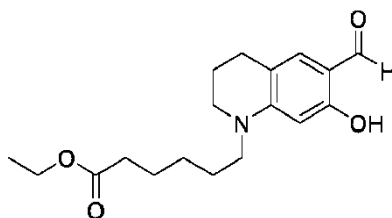
35

aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 17, como un aceite incoloro. El rendimiento fue de 13,7 g (74%).

5 Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 6,79 (d, 1H, J=8,0); 6,11 (bs, 2H); 4,14 (q, 2H, J=7,4); 3,27 (t, 2H, J=5,4); 3,20 (t, 2H, J=7,4); 2,67 (t, 2H, J=6,4); 2,32 (t, 2H, J=7,4); 1,92 (t, 2H, J=7,4); 1,72 a 1,56 (m; 4H); 1,36 (m, 2H); 1,25 (t, 3H, J=7,4)

Ejemplo 18

6-(6-formil-7-hidroxi-3,4-dihidroquinolina-1(2H)-il)hexanoato de etilo, Compuesto 18

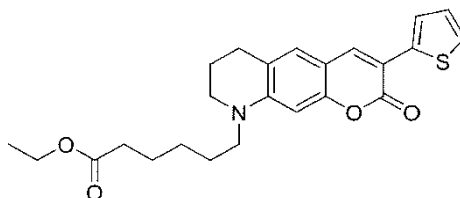


10 Un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, equipado con una barra de agitación, se enfrió a 0 °C. Se añadió DMF anhidra (35 mL, 25,29 mmol), seguido por la adición lenta de POCl_3 (20,9 mL, 223 mmol). A continuación, la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min y otros 30 min a temperatura ambiente. Se añadió lentamente una solución del compuesto 17 (13,0 g, 44,6 mmol) en DMF (anh, 30 mL) a temperatura ambiente (RT) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 20 hs. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se apagó por medio de la adición de pequeños trozos de hielo cada vez. El pH se neutralizó a un pH de 8 a 10 con NaOH 1M. La solución acuosa se extrajo con DCM (2 x 400 mL). El disolvente se eliminó al vacío para dar un aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 18, como un aceite incoloro. El rendimiento fue de 4,55 g (32%).

20 Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) pureza > 98%. δ 11,60 (s, 1H); 9,43 (s, 1H); 6,94 (s, 1H); 5,98 (s, 1H); 4,14 (q, 2H, J=7,0); 3,36 (t, 2H, J=5,8); 3,28 (t, 2H, J=7,4); 2,67 (t, 2H, J=6,2); 2,32 (t, 2H, J=7,4); 1,91 (m, 2H); 1,65 (m, 2H); 1,38 (m, 2H); 1,26 (t, 3H, J=7,0).

Ejemplo 19

6-(2-oxo-3-(tiofen-2-il)-7,8-dihidro-2H-piran[3,2-g]quinolin-9(6H)-il)hexanoato de etilo, Compuesto 19

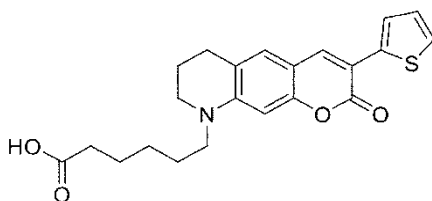


25 En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 100 mL, preparado con una barra de agitación magnética y un condensador de reflujo, se disolvió ácido acético de 2-tiofeno (2,00 g, 14,11 mmol) en anhídrido acético (20 ml). La solución resultante se agitó a 60 °C durante 15 a 20 min. Se añadió el compuesto 18 (4,5 g, 14,11 mmol) seguido por trietilamina (3,73 mL, 26,80 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 120 °C durante 3 hs. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió agua. El material orgánico se extrajo con EtOAc, se secó sobre NaSO_4 , se evaporó el disolvente y el material crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para dar un sólido naranja (2,1 g; r=35%).

30 Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) pureza > 98%. δ 7,39 (s, 1H); 7,21 (d, 1H, J=2,21); 7,08 (d, 1H, J=5,0); 6,83 (s, 1H); 6,06 (d, 1H, J=8,6); 6,02 (s); 4,14 (q, 2H); 3,27 (t, 2H); 3,20 (t, 2H); 2,67 (t, 2H); 2,32 (t, 2H); 1,92 (t, 2H); 1,72 a 1,56 (m; 4H); 1,36 (m, 2H); 1,25 (t, 3H).

Ejemplo 20

Ácido 6-(2-oxo-3-(tiofen-2-il)-7,8-dihidro-2H-piran[3,2-g]quinolin-9(6H)-il)hexanoico, Compuesto 20

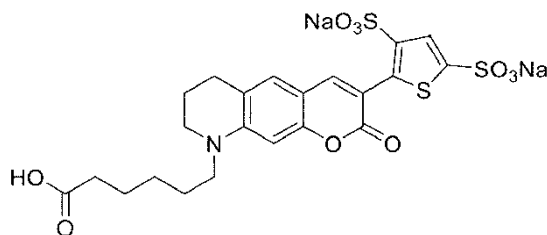


En un matraz de fondo redondo, con un cuello, de 10 mL, preparado con una barra de agitación magnética, se disolvió el compuesto 19 (2,1 g, 4,93 mmol) en tetrahidrofurano (5 mL). Se disolvió hidróxido de sodio (986 mg, 24,65 mmol) en agua (10 mL) y se añadieron las soluciones. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 hs. El tetrahidrofurano se eliminó al vacío y la fase acuosa se neutralizó con ácido clorhídrico acuoso (0,1M) hasta alcanzar un pH de 7. El material crudo se purificó en una columna de gel de sílice con un gradiente de hexanos/acetato de etilo como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 20 como un sólido amarillento. El rendimiento fue de 783 mg (40%).

Análisis: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) pureza > 98%. δ 8,01 (s, 1H), 7,83 (s, 1H); 7,64 (dd, 1H, J=3,5, 1,2), 7,30 (d, 1H, J=5,8); 7,08 (dd, 1H, J=4,7, 3,5), 7,03 (s, 1H); 3,48 (t, 2H, J=5,2); 3,38 (t, 2H, J=5,8) 2,78 (t, 2H, J=6,5); 1,96 (m, 2H) 1,72 a 1,56 (m; 4H); 1,41 (m, 2H).

Ejemplo 21

5-(9-(5-carboxipentilo)-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-piran[3,2-g]quinolin-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio, Compuesto 21

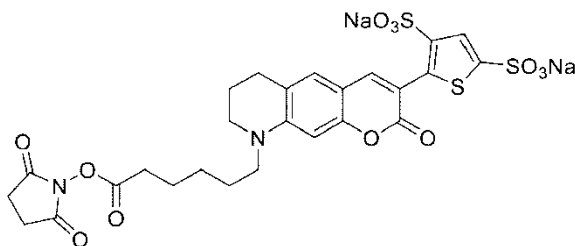


En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y entrada de argón, se disolvió el compuesto 20 (780 mg, 1,97 mmol) en DMF anhidra (20 mL). Se añadió el complejo de trióxido de azufre y dimetilformamida (12,07 g, 78,88 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 20 hs bajo una atmósfera inerte de Argón. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó por medio de la adición de NaHCO_3 (saturado). Los disolventes se eliminaron al vacío para dar el aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna C18 de fase inversa con un gradiente de agua/metanol como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 21, como un sólido amarillento. El producto obtenido se hizo pasar por una columna Sephadex LH20 (3x40 cm, eluyente H_2O) con un gradiente isocrático de agua como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 21, como un sólido amarillento. El rendimiento fue de 403 mg (34%).

Análisis: RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) pureza > 98%. δ 8,14 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,21 (s, 1H); 6,65 (s, 1H), 3,35 a 3,25 (m, 4H) 2,77 (t, 2H, J=5,8); 2,24 (t, 2H, J=7,8) 1,92 (m, 2H); 1,72 a 1,56 (m; 4H); 1,36 (m, 2H).

Ejemplo 22

5-(9-(6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-piran[3,2-g]quinolin-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio, Compuesto 22



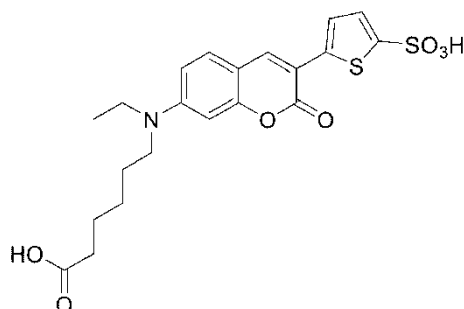
En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, preparado con una barra de agitación magnética y una entrada de argón, se disolvió el compuesto 21 (350 mg, 0,58 mmol) en DMF anhidra (5 mL). Se añadió TSTU (209 mg, 0,70 mmol) y DMAP (84 mg, 0,70 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se añadió gota a gota a éter dietílico (100 mL) bajo agitación. El precipitado naranja oscuro resultante se recogió por medio de filtración y se lavó con éter dietílico (5 mL) y diclorometano (5 mL). El sólido naranja oscuro se tomó en una cantidad mínima de dimetilformamida anhidra, se transfirió a un matraz de fondo

redondo de 10 mL y se concentró al vacío para obtener el producto deseado como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de mg (283 mg; 70%).

Análisis: RMN de ^1H (DMSO, 400 MHz) pureza > 98%. δ 8,07 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 6,76 (s, 1H), 6,62 (s, 1H), 3,27 (t, 2H); 3,20 (t, 2H) 2,67 (t, 2H); 2,73 (s, 4H); 2,32 (t, 2H); 1,92 (m, 2H) 1,72 a 1,56 (m; 4H); 1,36 (m, 2H).

5 Ejemplo 23

5-(7-((5-carboxipentilo)(etilo)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2 sulfonato de sodio, Compuesto 23



En un matraz de fondo redondo, con dos cuellos, secado a la llama, con una barra de agitación magnética y entrada de argón, se disolvió el compuesto 5 (90 mg, 0,23 mmol) en DMF anhidra (5 mL). Se añadió el complejo de trióxido de azufre y dimetilformamida (0,75 g, 4,65 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 20 hs bajo una atmósfera inerte de Argón. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se apagó por medio de la adición de NaHCO_3 (saturado, 5 mL). Los disolventes se eliminaron al vacío para dar el aceite crudo. El aceite crudo se purificó en una columna C18 de fase inversa con un gradiente de agua/metanol como eluyente para obtener el producto deseado, como un aceite naranja oscuro. El aceite naranja oscuro obtenido se hizo pasar por una columna Sephadex LH20 con un gradiente isocrático de agua como eluyente para obtener el producto deseado, el compuesto 6, como un sólido naranja oscuro. El rendimiento fue de 85 mg (78%).

Análisis: RMN de ^1H (D_2O , 600 MHz) pureza (>95%). δ 7,26 (s, 1H), 7,38 (d, 1H, $J=3,9$), 7,16 (d, 1H, $J=3,9$), 7,00 (d, 1H, $J=9,0$), 6,40 (d, 1H, $J=10,5$), 6,12 (s, 1H), 3,54 (q, 2H, $J=7,1$), 3,46 (t, 2H, $J=7,7$), 2,21 (t, 2H, $J=7,7$), 1,69 (m, 2H, 1,63 (m, 2H), 1,39 (m, 2H), 1,21 (t, 3H, $J=6,6$).

Abs máx. = 441 nm, Em máx. = 518 nm

Coef. ext. mol. = 26000 a 27000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

QY = 0,70 a 0,75

Ejemplo 24

Espectros de absorción y emisión de los compuestos 6, 14 y 23

El compuesto se diluyó en tampón PSB a pH 8,4. El espectro de absorción se midió en una cubeta de 1 cm en un espectrofotómetro UV Varian Cary 100 Bio. El espectro de emisión se midió en una cubeta de 1 cm en un espectrofluorómetro Varian Cary Eclipse. Los espectros de absorción y emisión del compuesto 6 se normalizaron y se muestran en la Figura 2. Los espectros muestran un ajuste óptimo del $\text{Abs}_{\text{máx}}$ con la fuente de excitación violeta de 405 nm y un gran desplazamiento de Stokes, lo que demuestra su utilidad en aplicaciones multiplex.

Ejemplo 25

Determinación del coeficiente de extinción molar

Se disolvió una muestra pesada con precisión del compuesto (6) en una cantidad medida de agua para obtener una solución madre de concentración conocida ($C = \text{mg/mL}$). La solución madre se diluyó en serie en un intervalo apropiado por medio de factores de dilución (D) en PBS. Los espectros de absorción se midieron en una cubeta de 1 cm en un espectrofotómetro Varian. Se determinaron los máximos de absorción (Amáx). El peso molecular (MW) del compuesto 6 se derivó de la estructura del ejemplo 6.

El coeficiente de extinción molar (ϵ) se calculó a partir de la siguiente ecuación

$$\epsilon = (\text{Amáx} \cdot D \cdot \text{MW}) / C$$

El coeficiente de extinción molar del compuesto 6 resultó ser de 26000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Ejemplo 26**Rendimiento cuántico de fluorescencia**

El rendimiento cuántico fluorescente del compuesto 6 se determinó mediante el uso de fluoresceína como estándar de referencia. El compuesto 6 se diluyó en serie en tampón de fosfato de sodio 10 mM con absorción a 400 nm y 427 nm $\leq 0,10$. La fluoresceína se diluyó en serie en hidróxido de sodio 0,1 mM. Las absorciones de todas las diluciones seriadas se midieron en cubetas de 1 cm en un espectrofotómetro UV-VIS Varian - Cary 100 BIO. Los espectros de emisión corregidos se registraron en un espectrofluorómetro Varian Eclipse en cubetas de 1 cm con excitación a 427 nm para todas las muestras. Los datos se representaron como integral de fluorescencia total frente a la absorbancia y se analizaron con el software Sigma plot. El rendimiento cuántico del compuesto 6 se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$QY = QY_{est} \times (Em_{muestra} / Em_{est}) \times (Ab_{est} / Abs_{muestra})$$

en la que QY es el rendimiento cuántico. QY_{est} es el rendimiento cuántico conocido de la fluoresceína. $Em_{muestra}$ y $Abs_{muestra}$ son la emisión y la absorción de fluorescencia medidas del compuesto 6. Em_{est} y Ab_{est} son la emisión y la absorción de fluorescencia medidas de la fluoresceína.

Se determinó que el rendimiento cuántico del compuesto (6) era de $0,7 \pm 0,1$.

Ejemplo 27**Dependencia del pH de la fluorescencia del colorante**

Se prepararon muestras del compuesto 6 en un intervalo de valores de pH a concentraciones finales iguales en soluciones acuosas apropiadas (HCl ac. para pH 1 y 2; fosfato de potasio 50 mM para pH 3 a 8,5; bicarbonato de sodio 50 mM para pH 9 a 10 y NaOH ac. para pH 12).

Las mediciones de la emisión de fluorescencia se llevaron a cabo a intervalos de 1pH de pH 1 a pH 8 y pH 12 en un espectrofluorómetro Varian Eclipse en cubetas de 1 cm con excitación a 417 nm para todas las muestras y la emisión de fluorescencia se midió a 510 nm.

La curva de dependencia del pH para el compuesto (6) se muestra en la Figura 3 y demuestra una completa independencia del pH entre los valores de pH 4 y 12.

Ejemplo 28**Preparación de conjugados de colorantes proteicos**

El anticuerpo policlonal de cabra contra el ratón (AbNova Cod. PAB9347) se diluyó hasta una concentración de 2 mg/mL en tampón de PBS 10 mM. La solución se dividió en ocho viales de muestra de 125 μ L cada uno a los que se añadieron 25 μ L de un tampón de bicarbonato de sodio (pH 9,6). El compuesto N-hidroxí succinimidil éster (7) se disolvió en DMSO anhidro y la concentración se determinó espectrofotométricamente. A cada alícuota de la muestra de anticuerpos se le añadieron cantidades calculadas, entre 10 y 100 equivalentes molares, del compuesto 7 con respecto al anticuerpo. Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora. El exceso de colorante no reaccionado se eliminó de las mezclas de reacción por medio de la separación en una columna Sephadex G25 y todas las muestras de conjugados de colorante aislados se analizaron para determinar la relación entre el colorante y la proteína (relación D/P) y la concentración. Las relaciones D/P obtenidas se graficaron contra los equivalentes molares del colorante utilizado y se muestran en la Figura 4.

A continuación, se midió la fluorescencia de cada muestra a igual concentración de anticuerpos (abs. 280 nm) y los valores de fluorescencia total obtenidos se graficaron contra las correspondientes relaciones D/P y se muestran en la Figura 5.

Las Figuras 4 y 5 demuestran una alta eficiencia de etiquetado y un excelente rendimiento cuántico fluorescente en un amplio intervalo de relaciones D/P.

Se preparó el compuesto 16 anti-ratón de cabra como se ha descrito anteriormente. Se comparó la fluorescencia total del conjugado compuesto anti-ratón de cabra 16 con el compuesto anti-ratón de cabra 7 por medio de la medición de la integral de fluorescencia total (banda de emisión total) a igual concentración de anticuerpo e igual relación D/P con excitación a 420 nm, (Figura 9a, 9b), lo que mostró una fluorescencia tres veces mayor para el conjugado di-sulfonado compuesto anti-ratón de cabra 7 en comparación con el conjugado no sulfonado compuesto anti-ratón de cabra 16.

Ejemplo 29**Conjugaciones de anticuerpos CD4 y CD19**

El anticuerpo de ratón anti-humano CD4 purificado (clon SK3) se adquirió de Biolegend (cod. 344602). Los anticuerpos de ratón anti-humano CD8 (clon RPA-T8, cod. 555364), ratón anti-humano CD4 (clon RPA-T4, cod. 300502) y ratón anti-humano CD19 (clon HIB19, cod. 555410), así como los correspondientes anticuerpos marcados BD Horizon V500:

V500-Anti-humano CD4 (clon: RPA-T4, cod. 560769), V500-Anti-humano CD19 (clon HIB19(RUO), cod. 561125) y el clon V500-Anti-humano CD8 (clon RPA-T8, cod. 560775) se adquirieron en BD Bioscience. Los anticuerpos purificados se suministraron a una concentración de 0,5 mg/mL. Como se ha descrito anteriormente, se llevaron a cabo conjugaciones a fin de evaluar las relaciones D/P óptimas y se muestran en las figuras 6a y 6b.

- 5 Las proporciones de colorante/proteína utilizadas en las reacciones de etiquetado, a varias concentraciones de proteína, produjeron conjugados con diferentes proporciones de colorante a proteína como se muestra en la tabla 3 para cada par de colorante/proteína.

Tabla 3

Proteína	Concentración de proteínas	Núm. de compuesto de colorante	Relación D/P
Ratón anti-humano CD4 clon SK3	0,5 mg/mL	7	3,8, 7,6, 9,9
Ratón anti-humano CD4 clon HIB19	0,5 mg/mL	7	2,4, 3,2, 4,3, 4,2, 5,4
Ratón anti-humano CD4 clon HIB19	2,0 mg/mL	7	10,0
Ratón anti-humano CD8 clon RPA-T8	0,5 mg/mL	7	2,6, 4,8, 8,3, 11,0

- 10 Se midió la fluorescencia de cada muestra a igual concentración de anticuerpos (abs 280 nm) y se graficó la fluorescencia total obtenida contra las correspondientes relaciones D/P (figura 7a y 7b).

Posteriormente, la fluorescencia total del conjugado de ratón anti-humano CD19-compuesto 7 se comparó con el ratón anti-humano CD19 V500 por medio de la medición de la integral de fluorescencia total (banda de emisión total) a igual concentración de anticuerpo e igual relación D/P con excitación a 420 nm. Las figuras 8a y 8b muestran una fluorescencia tres veces mayor para el conjugado del compuesto de colorante 7 de la presente invención en comparación con el conjugado de colorante BD Horizon V500.

- 15

Ejemplo 30

Análisis celular por citometría de flujo mediante el uso de conjugados de colorante-anticuerpo

Las células MAVER-1 se adquirieron de ATCC (cod. ATCC® CRL-3008™), a menos que se especifique lo contrario. Las líneas celulares propagadas en cultivos en suspensión se cultivaron en medio RPMI1640 complementado con un 10% de FBS.

- 20

Las PBMC se aislaron de las capas leucocitarias por medio de la técnica de gradiente de densidad estándar Ficoll-Hypaque. Se obtuvo una capa de sangre humana de un donante sano en el Banco de Sangre C.R.S. (Centro Regionale Sangue), Ospedale Maggiore - Largo Nigrisoli, 2 - 40133 Bologna, Italia.

- 25 Se tiñeron muestras de 10^6 células con el conjugado de colorante durante 15 a 30 minutos a +4 °C en la oscuridad con una cantidad de conjugado de colorante de 30 ng para linfocitos de sangre periférica (Figura 8) y 5 ug para MAVER-1 (Figura 9) por prueba en tampón de tinción (0,5% de BSA en D-PBS). Tras la tinción, la muestra se lavó (por medio de la adición de 1 ml de tampón de tinción) dos veces, se resuspendió con D-PBS y se mantuvo a 4 °C en la oscuridad hasta la adquisición por citometría de flujo. La adquisición de las células teñidas se llevó a cabo mediante el uso de un BD FACS ARIAll (BD Biosciences, San José, California) equipado con un láser azul (488 nm), uno rojo (633 nm) y uno violeta (405 nm). La óptica de detección incluye un filtro 530/30. El citómetro de flujo se configuró siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo un seguimiento del citómetro y de la configuración para obtener la mejor identificación de las poblaciones brillantes y la mejor resolución de las poblaciones tenues. La adquisición por citometría de flujo de la muestra de células teñidas se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos del fabricante, y los datos se analizaron excluyendo el doblete por medio de una puerta de geometría de pulso (FSC-W x FSC-A) para obtener la intensidad de fluorescencia de la población celular de interés.
- 30
- 35

Se entenderá que los procedimientos de preparación de conjugados de anticuerpos utilizados y las condiciones de reacción particulares utilizadas pueden afectar al resultado del ensayo. La experimentación rutinaria y la titulación se deben llevar a cabo con células y reactivos que imiten cada una de las condiciones experimentales para determinar la condición óptima de tinción.

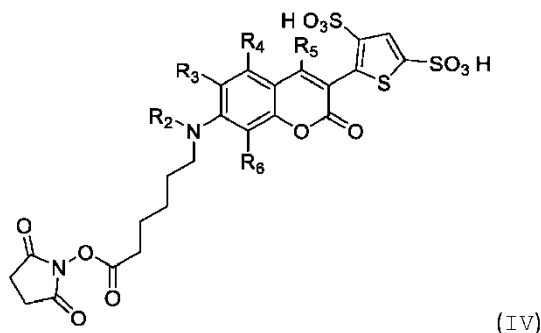
- 40

La Figura 10 muestra la expresión del anticuerpo de ratón anti-humano CD4 en linfocitos de un donante sano en citometría de flujo mediante el uso del conjugado de ratón anti-humano CD4-compuesto 7.

La Figura 11 muestra la línea de células MAVER-1 teñidas con el conjugado de ratón anti-humano CD19-compuesto 7 (histograma relleno blanco) y sin teñir (histograma relleno gris). Los resultados indican que los conjugados de colorante de la presente invención son útiles para preparar reactivos de detección específicos de antígenos para ensayos de inmunofluorescencia analizados por citometría de flujo.

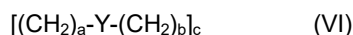
REIVINDICACIONES

1. Colorante de 7-amino-3-tienil cumarina de la fórmula (IV) :



en la que

- 5 R2, se selecciona entre L-WSG, y alquilo sustituido o no sustituido;
R3, R4, R5, y R6 son H;
L es un enlazador de la fórmula (VI):



en la que

- 10 Y es igual o diferente y se selecciona entre ninguno, O, S, NH, NR9, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, CO-S, CO-O-CO, aminotriazina, éter de triazinilo, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-CO-O, O-POR9-O, SO₂, SO₂-O, aminoácido, arilo y heteroarilo,
en el que R9 es alquilo o WSG,
a y c pueden ser iguales o diferentes y son un número entero de 1 a 10, y
15 b es un número entero de 0 a 10;
WSG es un grupo soluble en agua y se selecciona entre ácido sulfónico, sulfato, ácido alquilsulfónico, ácido tiosulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, ácido borónico, amonio, piridinio, acridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y -(CH₂-CH₂-O)_x en el que x es un número entero de 1 a 10;
y en el que uno o más sustituyentes, si están presentes, del grupo alquilo se seleccionan entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcocarbonilamino, alcocarbonilo, hidroxialcoxi, alcocalcoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilamino, ciano, alquilazida, azida, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo y WSG;
y sales de los mismos.

- 25 2. Colorante de 7-amino-3-tienil cumarina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Y se selecciona entre ninguno, O, S, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, CO-S, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-COO, SO₂-O, arilo, heteroarilo y aminoácido, en el que R9 es como se define en la reivindicación 1.

- 30 3. Colorante de 7-amino-3-tienil cumarina de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el WSG se selecciona entre ácido sulfónico, ácido alquilsulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, amonio, piridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y -(CH₂-CH₂-O)_x en el que x es un número entero de 1 a 10.

4. Colorante de 7-amino-3-tienil cumarina de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, seleccionado entre:

5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio;

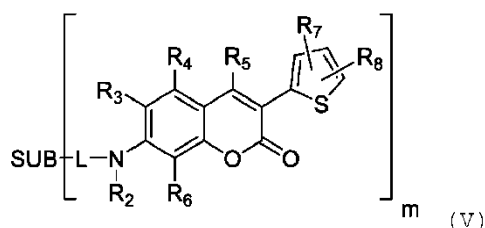
- 35 5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)(3-sulfonatopropil)amino)-2-oxo-2H-cromo-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio;

Ácido 5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)(2-(2-metoxietoxi)etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico;

Ácido 5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)(2-oxo-2-((3-sulfopropil)amino)etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico;

- 40 Ácido 5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)(3-(N-(2-sulfoetil)sulfamoyl)propil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico.

5. Conjugado de colorante de 7-amino-3-tienil cumarina que tiene la fórmula (V):



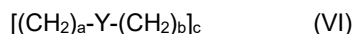
en la que

R2 se selecciona de entre L-WSG, y alquilo sustituido o no sustituido;

R3, R4, R5 y R6 son átomos de hidrógeno;

R7 y R8 están unidos al anillo de tienilo en las posiciones 2 y 4, y son grupos de ácido sulfónico;

L es un enlazador de la fórmula (VI):



en la que

Y es igual o diferente y se selecciona entre ninguno, O, S, NH, NR9, SO₂-NH, SO₂-NR9, CO-NH, CO-O, CO-S, CO-O-CO, aminotriazina, éter de triazinilo, NH-CO-NH, NH-CS-NH, NH-CO-O, O-POR9-O, SO₂, SO₂-O, aminoácido, arilo y heteroarilo,

en el que R9 es alquilo o WSG,

a y c pueden ser iguales o diferentes y son un número entero de 1 a 10, y

b es un número entero de 0 a 10;

WSG es un grupo soluble en agua y se selecciona entre ácido sulfónico, sulfato, ácido alquilsulfónico, ácido tiosulfónico, sulfonamida, fosfato, ácido fosfónico, ácido borónico, amonio, piridinio, acridinio, ciclodextrina, monosacárido, oligosacárido, dextrano y -(CH₂-CH₂-O)_x en el que x es un número entero de 1 a 10;

m es un número entero de 1 a 25;

SUB es un aminoácido, un péptido, una proteína, un sacárido, un nucleósido, un nucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico, un hapteno, un fármaco o un lípido

y en el que uno o más sustituyentes, si están presentes, del grupo alquilo se seleccionan entre hidroxilo, trifluorometilo, halógeno, alcoxi, dialquilamino, alquilcarbonilamino, alcóxicarbonilamino, alcóxicarbonilo, hidroxialcoxi, alcóxicoxi, alquilsulfonamido, arilsulfonamido, carboxialcoxi, carboxialquilamino, ciano, alquilazida, azida, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloheteroalquilo, cicloheteroalquilo y WSG;

y sales de los mismos.

6. Un kit que comprende al menos un colorante de 7-amino-3-tienil cumarina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Un kit que comprende al menos un conjugado de colorante de 7-amino-3-tienil cumarina como se define en la reivindicación 5.

8. Colorante de 7-amino-3-tienil cumarina seleccionado entre:

5-(9-(6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)-2-oxo-6,7,8,9-tetrahidro-2H-piran[3,2-g]quinolin-3-il)tiofen-2,4-disulfonato de sodio;

Ácido 5-(7-((N-(6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)sulfamoil)propil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico;

Ácido 5-(7-((4-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)carbonilo) bencilico)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfónico;

2,2'-((5-(7-((6-((2,5-dioxopirrolidina-1-il)oxi)-6-oxohexil)(etil)amino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2,4-disulfonil)bis(azandiil))bis(ácido etan-1-sulfónico);

2,5-dioxopirrolidina-1-il 6-((3-(3,5-disulfamoiltiofen-2-il)-2-oxo-2H-cromo-7-il)(etil)amino)hexanoato.

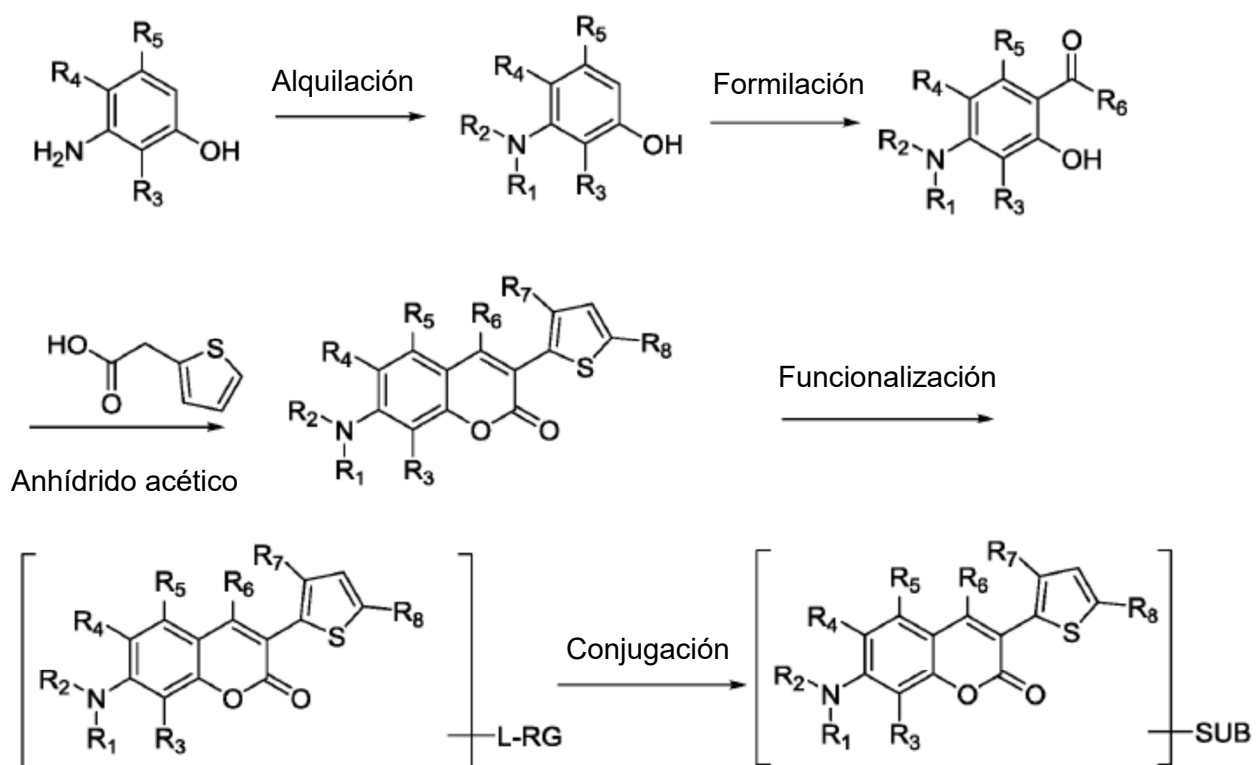


Figura 1

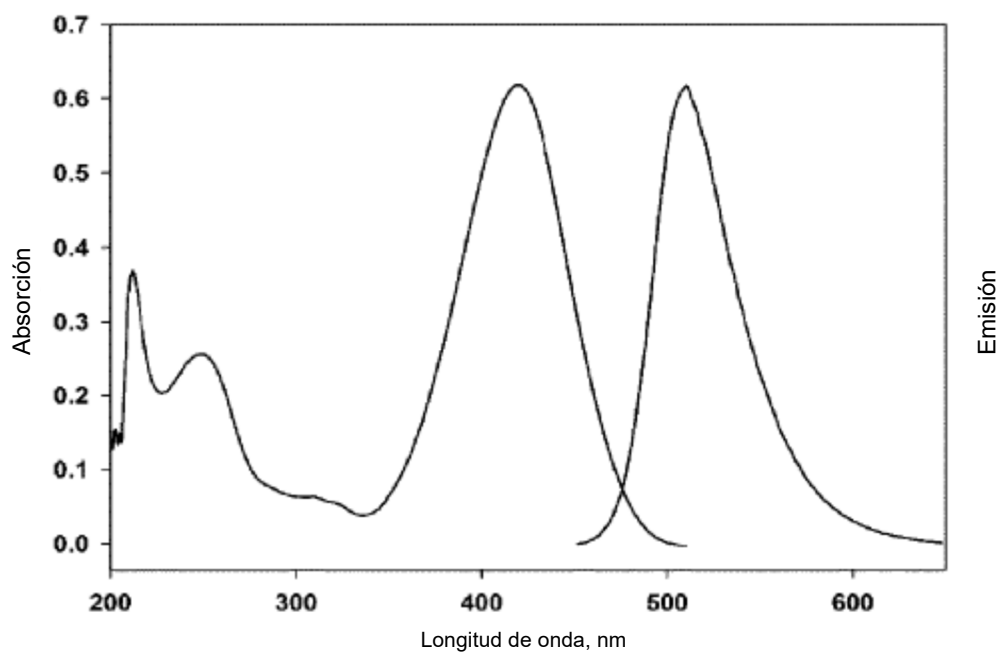


Figura 2

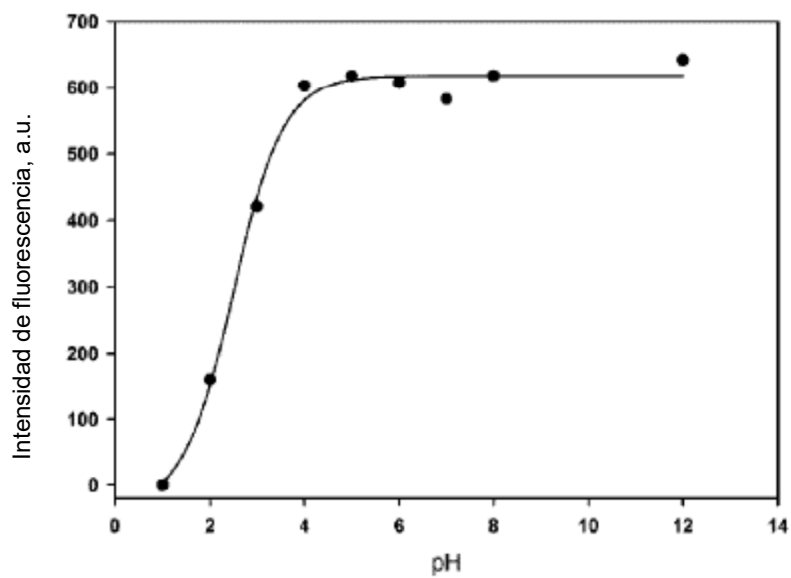


Figura 3

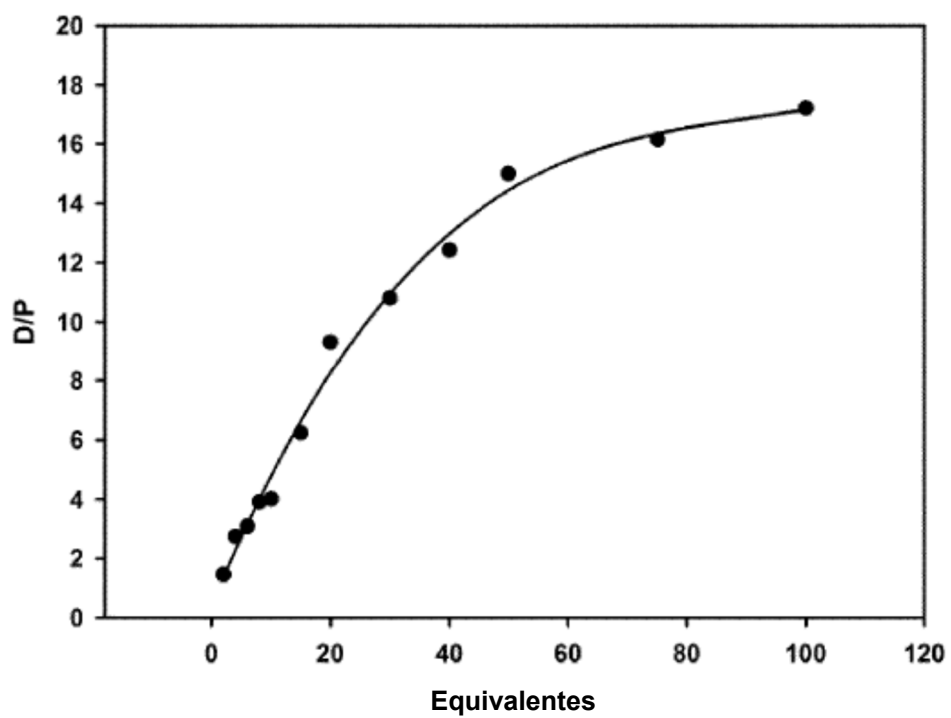


Figura 4

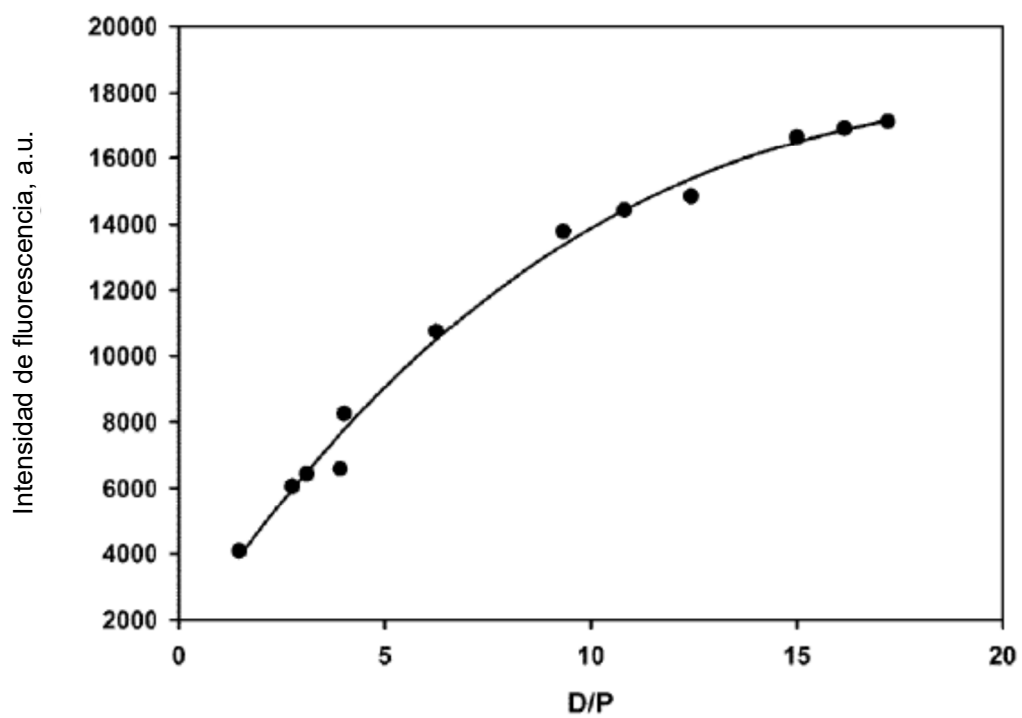


Figura 5

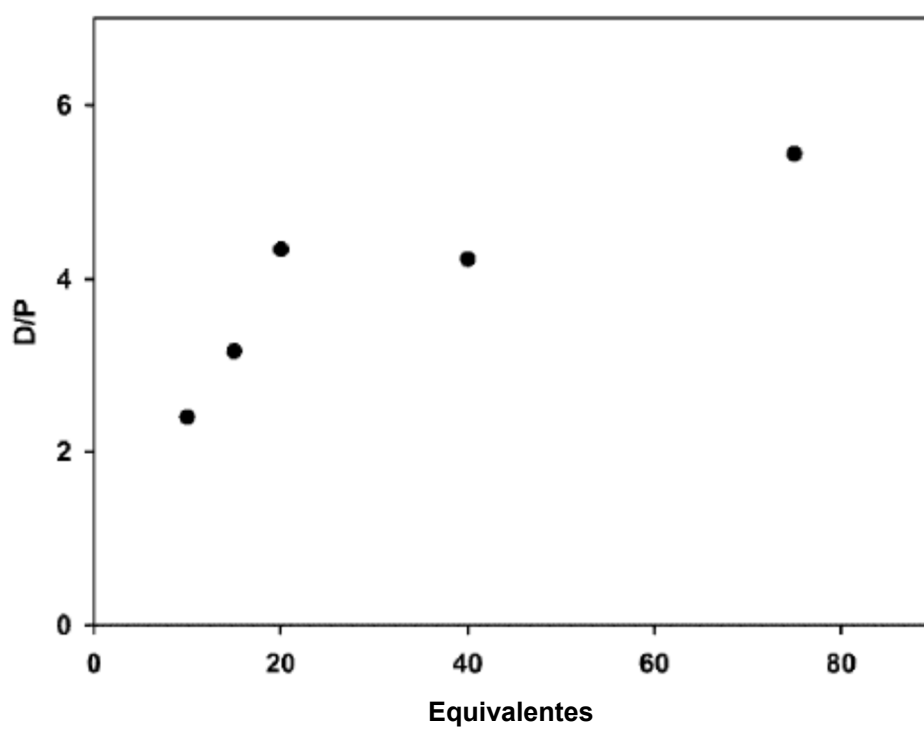


Figura 6a

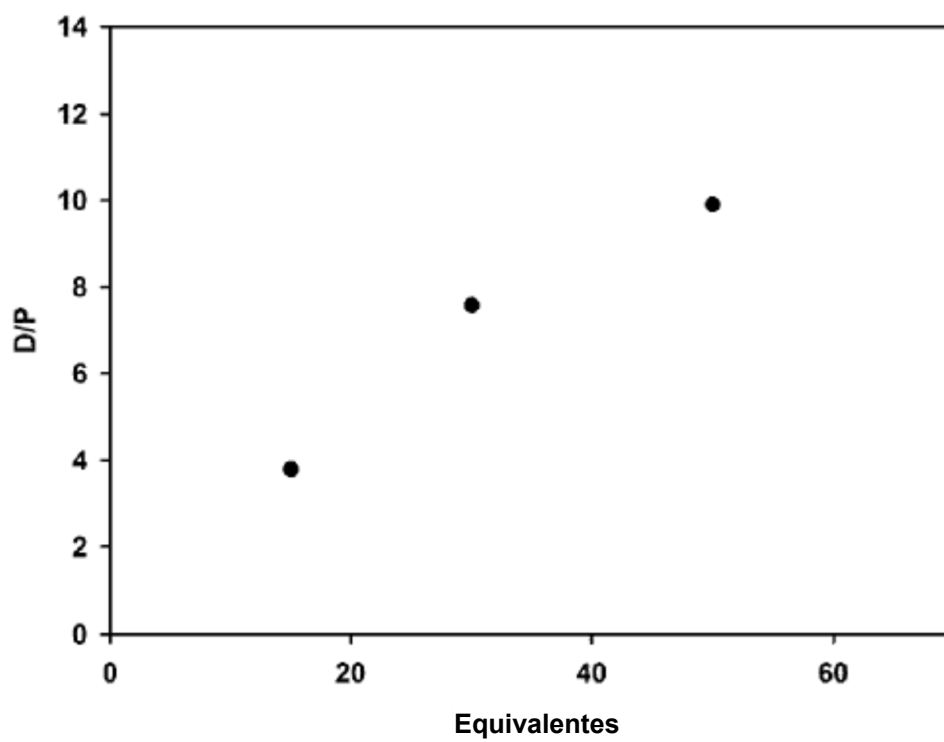


Figura 6b

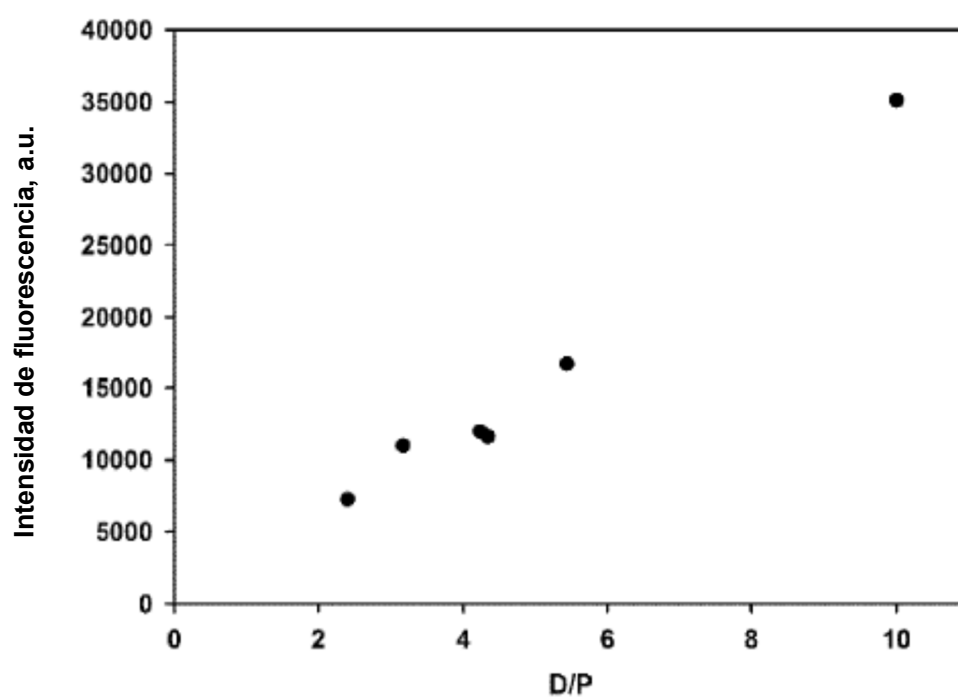


Figura 7a.

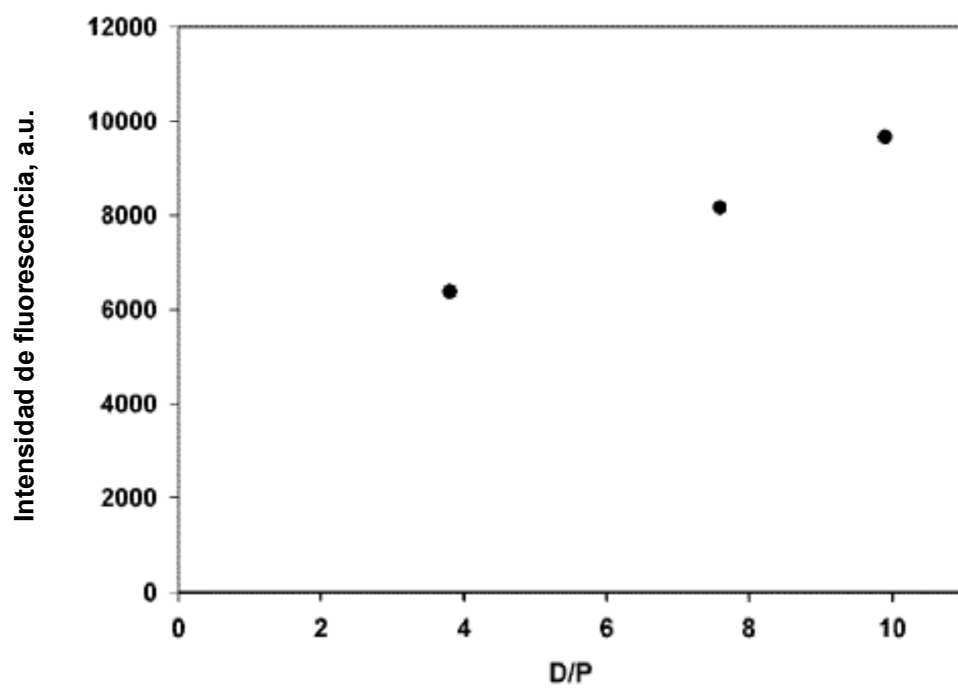


Figura 7b.

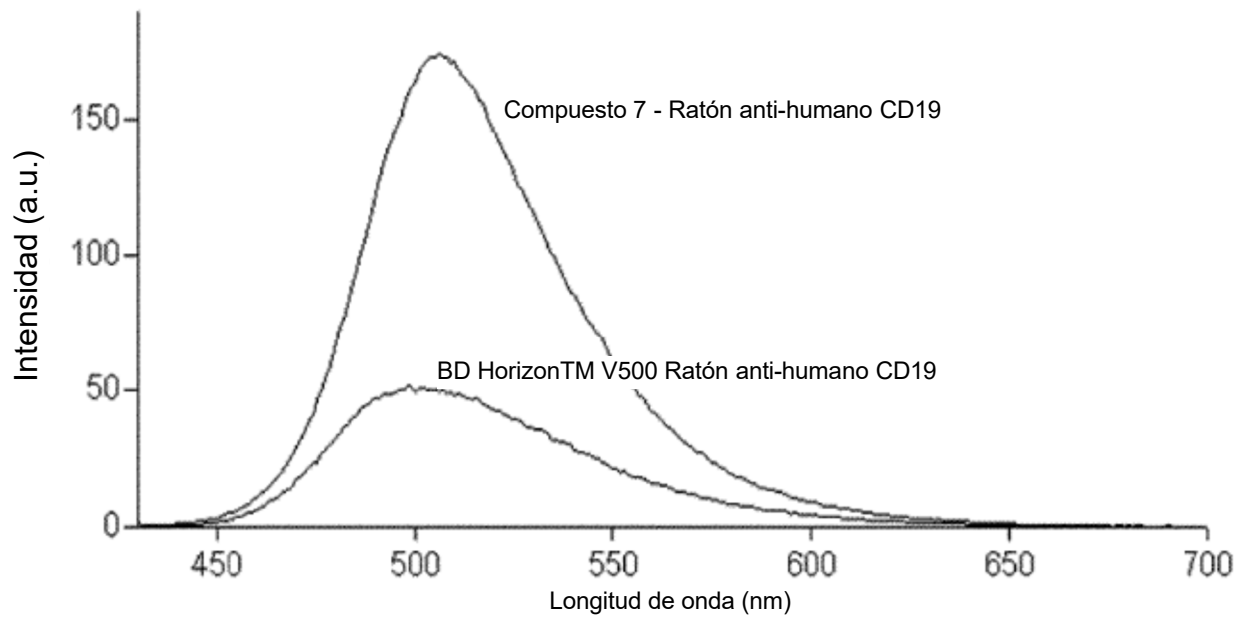


Figura 8a

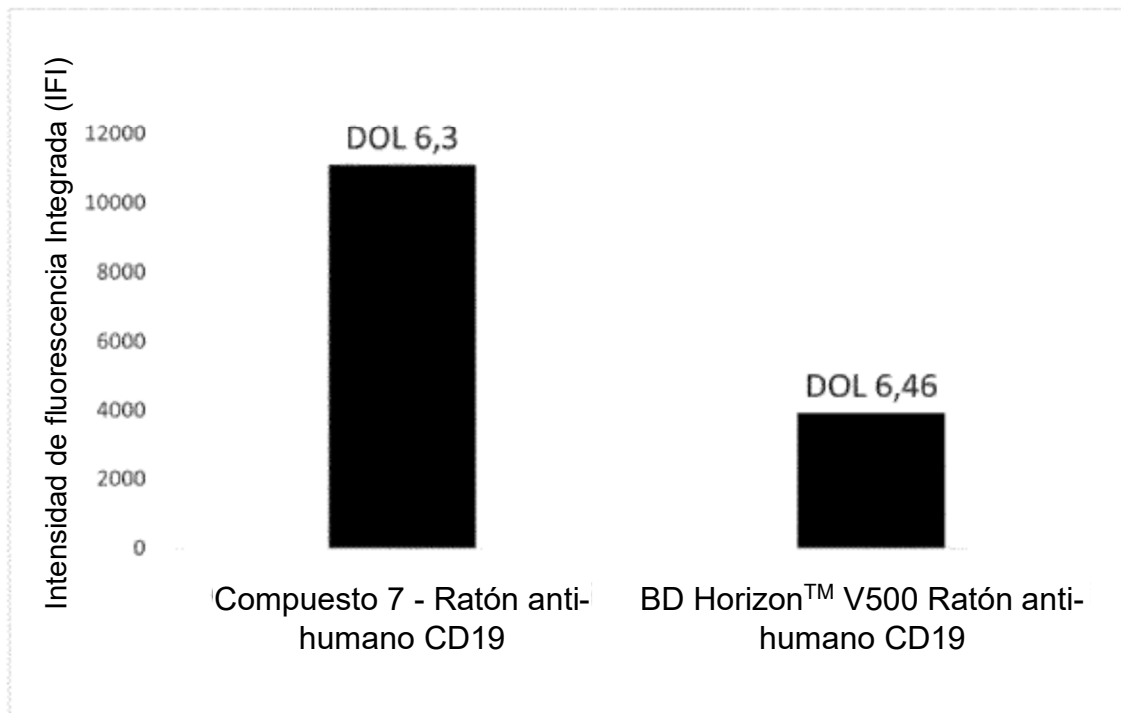


Figura 8b

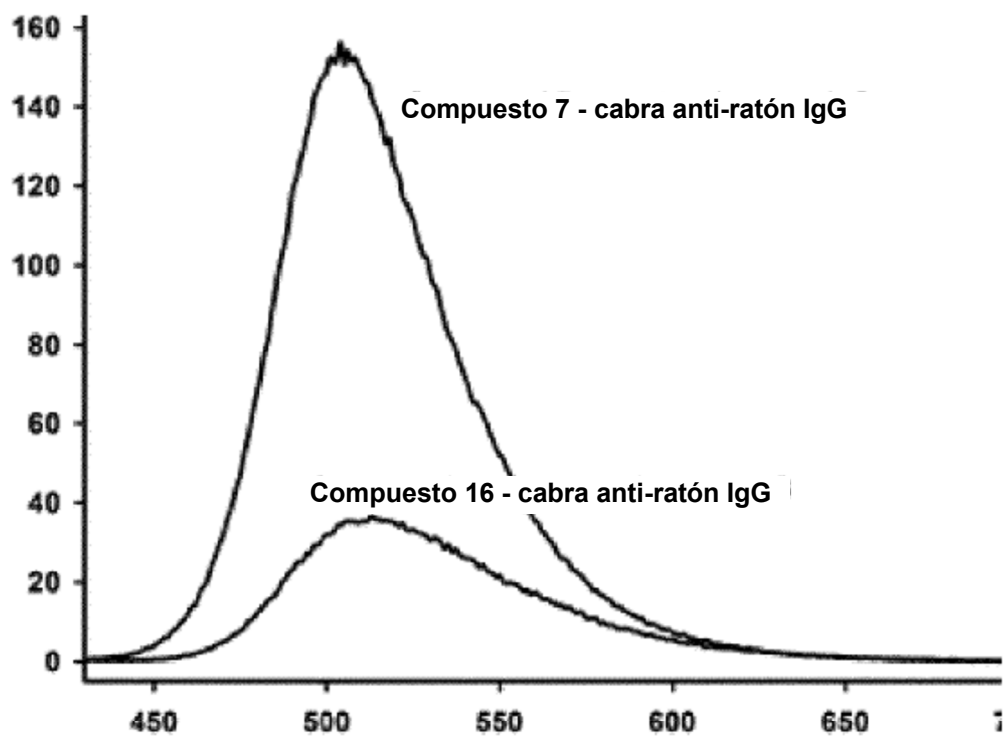


Figura 9a

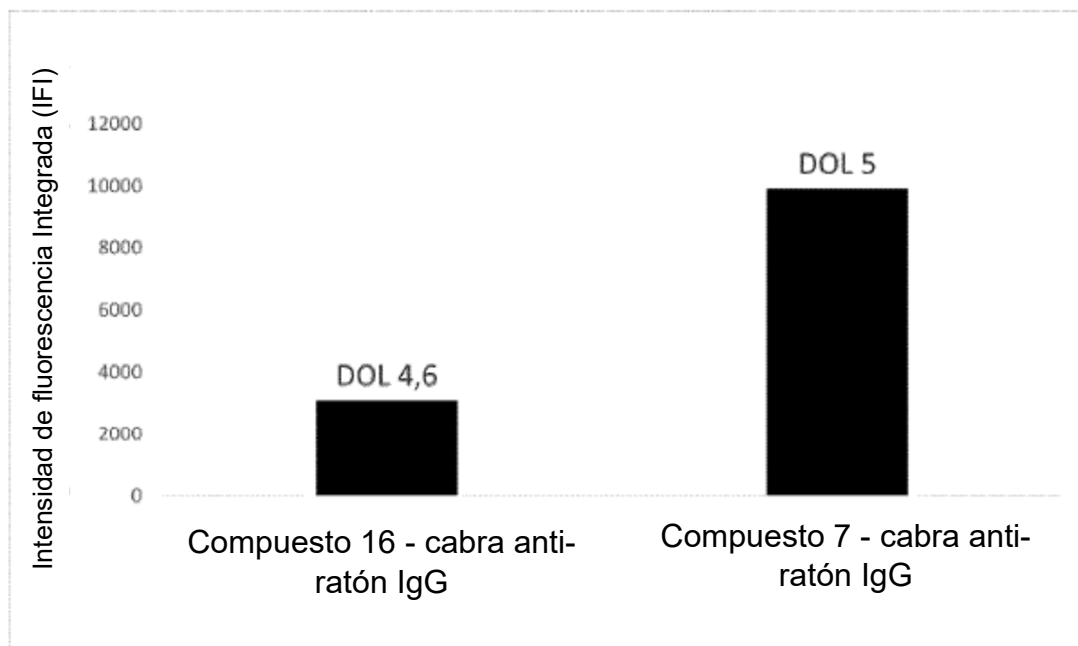


Figura 9b

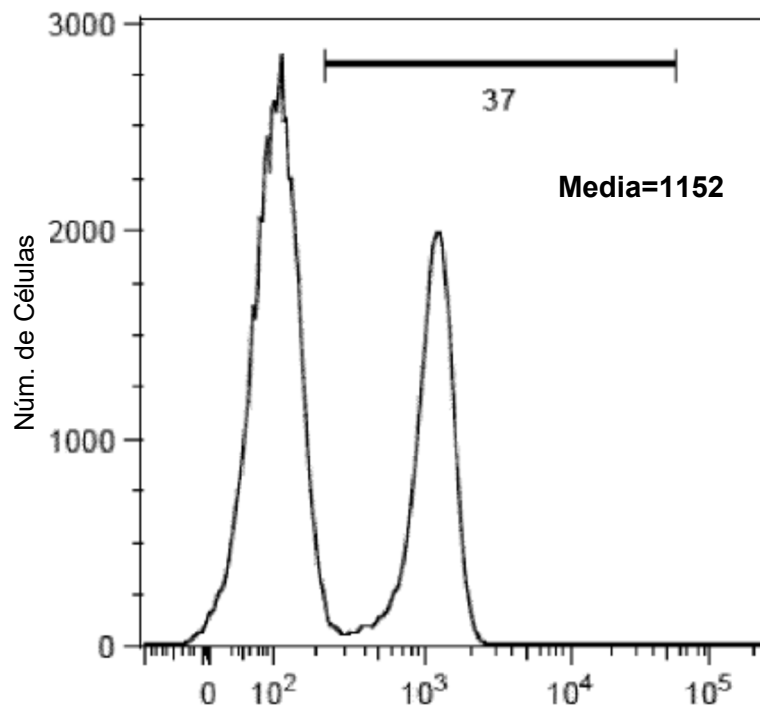


Figura 10

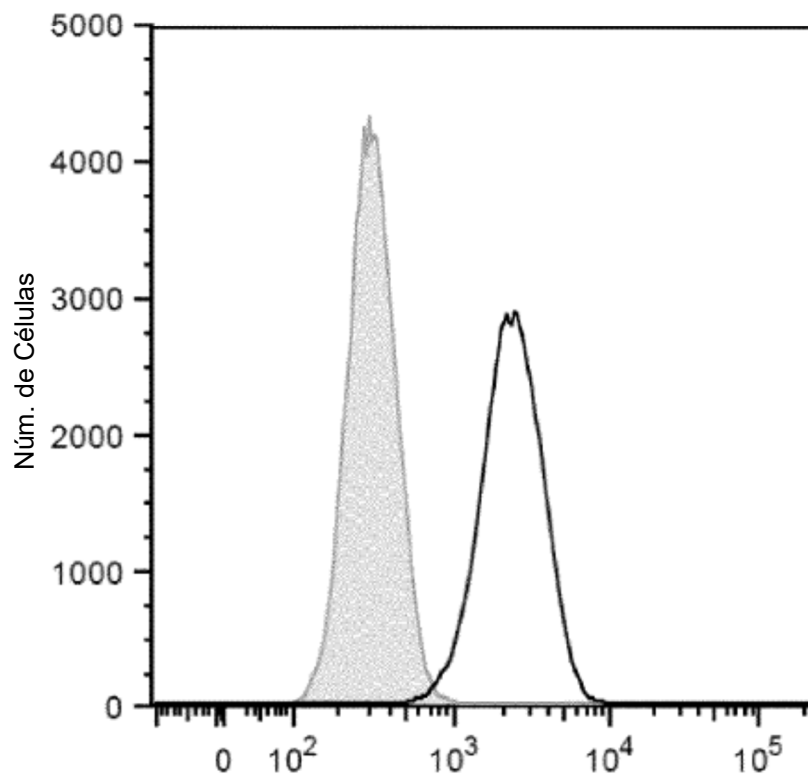


Figura 11