



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 813**

51 Int. Cl.:
C07D 221/12 (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 219/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07101154 .8**
96 Fecha de presentación : **23.06.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **1792897**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **Intercaladores con una alta afinidad para la unión a ADN y métodos de uso.**

30 Prioridad: **30.06.1993 US 86285**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.01.2010

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6A-1, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

72 Inventor/es: **Bieniarz, Christopher;**
Huff, Jeffrey, Bruce y
Henrard, Denis, R.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 331 813 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

Intercaladores con una alta afinidad para la unión a ADN y métodos de uso.

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a compuestos intercaladores, y al uso de dichos compuestos, comprendiendo cada uno de ellos una fracción de intercalador sustituida, derivatizada con una cadena funcionalizada, teniendo dichos compuestos una alta afinidad para la unión con una molécula de ADN. Estos compuestos intercaladores presentan una mejor unión con una molécula de ADN dentro de las metodologías conocidas que requieren la inserción de intercalador en la molécula de ADN. Además, la invención se refiere a una unión mejorada de moléculas de ADN mediante un segmento que funciona como intercalador utilizado en etiquetado, captura, inserción terapéutica, ensayo y similares, con un mejor rendimiento del intercalador gracias a la mayor eficiencia de uso de los compuestos.

El término “intercalador” fue introducido en el campo de la química hace unos 30 años para describir la inserción de compuestos heteroaromáticos o aromáticos planares entre pares de base adyacentes de ADN de doble hebra (ADNs). Muchas compuestos intercaladores de ADN dan lugar a propiedades interesantes biológicamente. Por lo general, se coincide en que estas propiedades están relacionadas con su reactividad con ADN. En la investigación para encontrar compuestos más activos, resulta lógico que se diseñen moléculas con la afinidad más alta posible para ADN. En la década de 1990, se describió que los complejos de homodímero de etidio con ADNs actuaban a relaciones de un dímero por cada cuatro a cinco pares de base, y eran estables para electroforesis sobre geles de agarosa. Esto permitía fluorescencia, detección y cuantificación de fragmentos de ADN con una sensibilidad de picograma tras la separación y completa ausencia de la mancha de fondo. Se ha buscado tal resultado a través de distintas manipulaciones de compuestos intercaladores, como por ejemplo, mediante compuestos funcionales compuestos de colorantes de intercalado de ADN. Como resultado de estas tentativas, se han utilizado agentes de intercalado de ADN empleando bromuro de etidio en diversos procedimientos de análisis de ADN.

Se han utilizado varios agentes de intercalado de ADN descritos utilizando bromuro de etidio en multitud de procedimientos de análisis de ADN, como por ejemplo:

Christen y cols., “An Ethidium Bromide-Agarose Plate Assay for the Nonradioactive Detection of CDNA Synthesis”, Anal. Biochem., 178 (2), 1 mayo, 1989, pp. 269-272, describe el uso de bromuro de etidio para determinar el éxito de las reacciones de síntesis de ADNc. Dado que se puede utilizar el bromuro de etidio en agarosa para cuantificar ARN y ADN, las condiciones en las que se utiliza una mayor fluorescencia de ADN de doble hebra estaban diseñadas para ensayar la síntesis de ADN de doble hebra a partir de ARNm. El bromuro de etidio a 5 microgramos/ml en agarosa permitió una detección cuantitativa de ADNc en el intervalo de 0,03 a 0,0015 microgramos. Dodecil sulfato sódico tuvo un efecto negativo en la medida de ADNc. Tras el análisis de ADNc por electroforesis de gel alcalino y el manchado en 5 microgramos/ml de bromuro de etidio permitió una secuenciación rápida y precisa de ADNc y requirió solamente de 0,01 a 0,05 microgramos de ADNc.

Petersen, S.E., “Accuracy and Reliability of Flow Cytometry DNA Analysis Using a Simple, One-Step Ethidium Bromide Staining Protocol”, Cytometry, 7(4), julio, 1986, pp. 301-306, describe la investigación de fuentes de variación y error para un análisis citométrico de flujo simple del contenido de ADN de núcleos aislados con detergente manchados con bromuro de etidio.

En “Ethidium Bromide in the Detection of Antibodies to DNA and of Circulating DNA by Two-Stage Counterimmunoelectrophoresis”, J. Immunol. Methods, 85(1), 17 de dic. 1985, pp. 217-220, Riboldi, y cols., se describe que la utilización de bromuro de etidio en un intento por superar las limitaciones de la contraimmunoelectroforesis en la detección de anticuerpos anti-ADN en precipitación o ADN en circulación, para aumentar la visibilidad de líneas de precipitación y para confirmar su especificidad.

W.A. Denny describió en “DNA-Intercalating Ligands as Anti-Cancer Drugs: Prospects for Future Design” Anti-cancer Drug Des., 4(4), Dec., 1989, pp. 241-263, que el interés por ligandos de intercalado de ADN como fármacos contra el cáncer se ha desarrollado enormemente desde el éxito clínico de doxorubicina.

Se ha descrito una serie de agentes para el etiquetado de ácidos nucleicos, ya sea sonda o diana, para facilitar la detección de ácido nucleico diana. Las etiquetas adecuadas pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radioactividad, colorimetría, difracción de rayos X o absorción, magnetismo o actividad enzimática e incluyen, por ejemplo, fluoróforos, cromóforos, isótopos radioactivos, enzimas y ligandos que tienen socios de unión específicos.

Los colorantes fluorescentes son adecuados para detectar ácidos nucleicos. Por ejemplo, bromuro de etidio es un agente de intercalado que presenta una mayor fluorescencia cuando se une a ADN de doble hebra que cuando está en solución libre. El bromuro de etidio se puede utilizar para detectar ácidos nucleicos tanto de hebra simple como doble, si bien la afinidad del bromuro de etidio para un ácido nucleico de hebra simple es relativamente baja. Se utiliza bromuro de etidio de manera rutinaria para detectar ácidos nucleicos tras electroforesis de gel. Tras el fraccionado de tamaño en una matriz de gel aproximada, por ejemplo, agarosa o acrilamida, se empapa el gel en una solución diluida de bromuro de etidio.

Se ha descrito el uso de sondas de polinucleótido etiquetadas con fluorescencia y ensayos de hibridación de polinucleótido. De acuerdo con estos métodos, se preparan sondas uniendo una fracción de absorbedor emisor concreta a los extremos de tres cebadores y cinco cebadores de los fragmentos de ácido nucleico. Los fragmentos tienen la capacidad de hibridarse con posiciones adyacentes de un ADN diana de manera que si ambos fragmentos se hibridan, la proximidad de las fracciones absorbidora y emisora tiene como resultado una fluorescencia emisora detectable. De acuerdo con estos métodos, se introduce el colorante fluorescente en el ADN diana una vez que se han completado todas las polimerizaciones de ácido nucleico *in vitro*. Se han descrito los efectos inhibidores de los agentes de intercalado de ácido nucleico polimerasa en numerosas localizaciones.

Los colorantes de unión de ADN son útiles como antibióticos por los efectos inhibidores de los procesos de replicación de ácido nucleico que son resultado de la unión del agente con la plantilla. Se ha descrito el uso de agentes de intercalado para bloquear la infectividad del virus de la gripe o herpes. Se ha descrito y presentado informes también de que una serie de agentes de unión a ADN, tanto intercaladores como no intercaladores, inhiben la replicación de ácido nucleico. Por ejemplo, bromuro de etidio inhibe la replicación de ADN.

Se ha proporcionado métodos para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Dichos métodos comprenden las etapas de (a) proporcionar una mezcla de reacción ampliada que comprende una muestra, un agente de unión a ADN, caracterizándose dicho agente por proporcionar una señal detectable cuando está unido a ácido nucleico de hebra doble, distinguiéndose dicha señal de la señal que proporciona dicho agente cuando está sin unir, y reactivos para amplificación; (b) determinar la cantidad de señal producida por una mezcla de la etapa (a); (c) tratar dicha mezcla en condiciones para amplificación del ácido nucleico diana; (d) determinar la cantidad de dicha señal producida por la mezcla de la etapa (c); y (e) determinar si se ha producido la amplificación. Estos agentes de intercalado de unión de ADN, como bromuro de etidio o homodímero de etidio, permiten un estudio fluorométrico de la interacción de diversas moléculas con ADN.

El agente de intercalado útil para la unión de ADN o la detección de ácidos nucleicos ampliados es un agente o una fracción que tiene la capacidad de insertarse entre el par de base apilado en la doble hélice de ácido nucleico. Los agentes de intercalado, como homodímero de etidio y bromuro de etidio, emiten fluorescencia de manera más intensa cuando se intercalan en el ADN de doble hebra que cuando están unidos a un ADN de hebra simple, ARN o en solución. Otros usos de intercaladores se han aplicado al campo de la separación y aislamiento o purificación de ácidos nucleicos desde especímenes clínicos o biológicos complejos.

Se conocen diversos métodos de separación de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) desde muestras biológicas líquidas dentro de la especialidad, pero requieren mucho tiempo o están plagadas de complicaciones. Se sabe que ADN se adhiere a nitrocelulosa. Se aplica la muestra líquida que contiene ADN a un filtro de nitrocelulosa y se adhiere o se une el ADN al filtro.

Otro método de separación de ADN desde muestras es ultracentrifugado con gradientes de densidad de sacarosa o cloruro de cesio. Se separa el ADN de otras macromoléculas, como proteínas, a través de este método con arreglo al coeficiente de sedimentación o densidad de flotación. Se estratifica la muestra biológica sobre el gradiente de densidad en un tubo de centrífuga y se centrifuga a una velocidad muy alta durante períodos de tiempo prolongados para que el ADN se desplace a través del gradiente de densidad. Este método, si bien es satisfactorio, consume mucho tiempo y supone un intenso trabajo. El tiempo de centrifugado puede ser de 20 horas o más por muestra. Por otra parte, si se centrifuga la muestra durante mucho tiempo, el ADN no solamente se separará de la muestra, sino que también pasará completamente a través del gradiente hasta el mismo fondo del tubo de centrífuga junto con otros constituyentes de la muestra. Por consiguiente, este método tampoco resulta adecuado como método rápido y sencillo para la separación de ADN desde muestras complejas.

Se aplica también la electroforesis de gel de poliacrilamida y agarosa para separar ADN de muestras biológicas. En este método, se aplica la muestra sobre un extremo de un receptáculo de vidrio o plástico que contiene el gel y se aplica una corriente eléctrica a través de la longitud del receptáculo. Las moléculas de ácido nucleico cargadas negativamente se desplazan hacia el ánodo, moviéndose las moléculas más grandes más lentamente. Los índices de desplazamiento de las moléculas dependen de sus pesos moleculares y de la concentración y grado de reticulación en el material de gel. A continuación, se separa el ADN del gel cortando la porción del gel en la que está localizado el ADN y finalmente se extrae el ADN. Otra vez más, este método consume mucho tiempo y supone un intenso trabajo y es necesario separar el ADN del gel. Cuando se separa el ADN a través del método de gel por electroforesis o por centrifugado, es necesario manchar el ADN de alguna manera para visualizarlo. Típicamente, se ha utilizado bromuro de etidio (EtBr) como agente de manchado. El bromuro de etidio se adhiere al ADN por intercalado entre los pares de base de la estructura de doble hélice del ADN.

Más recientemente, se ha sintetizado homodímero de etidio y se han introducido intercaladores bifuncionales con el fin de permitir un estudio fluorométrico que incluye la interacción de dichas moléculas con ADN. Se ha determinado que el homodímero de etidio ("EthD") se une a ADN de doble hebra ("ADNs") con una fuerza aproximadamente dos (2) órdenes de magnitud mayor que el bromuro de etidio. Se han obtenido complejos de EthD con ADNs en una relación de un dímero por cada 4 a 5 pares de base y se ha observado que son estables para electroforesis sobre base de agarosa. En la unión a ADNs, el rendimiento cuántico de fluorescencia del dímero se multiplica por 40 independiente de la secuencia de nucleótido.

Se pueden formar complejos de ADNds-fluoroporo estables para obtener cualquiera de los miles de fluoroporos de cada uno, según se desee. En condiciones controladas adecuadas, estos complejos no transfieren colorantes a otros ácidos nucleicos o proteína. Una importante propiedad de estos complejos es que su intensidad de emisión de fluorescencia va en función lineal al número de moléculas de colorante intercaladas. A medida que se dispone de manera más general de aparatos de detección de fluorescencia de alta sensibilidad, la posibilidad de utilizar colorantes para reemplazar, por ejemplo, la radioactividad para detección de sensibilidad de ADN, está adquiriendo cada vez más valor.

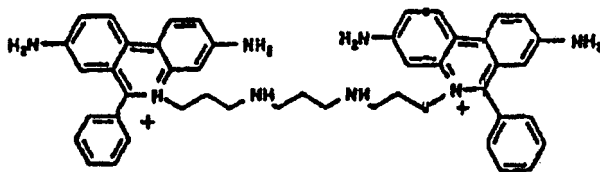
Los complejos de colorante-ADNds representan una nueva familia de etiquetas de fluorescencia con una amplia gama de propiedades espectroscópicas cuya composición, estructura y tamaño se pueden adaptar a cada aplicación en particular. Las moléculas de ADN pueden derivatizarse fácilmente para unir biotina, digoxigenina y cualquiera de los varios sustituyentes que pueden ser reconocidos por avidina o anticuerpos. Dichas moléculas de ADN derivatizadas cargadas con colorante pueden permitir la detección a un nivel de sensibilidad mucho mayor en numerosas aplicaciones, como por ejemplo, inmunoensayo, fluorescencia e hibridación in situ de cromosomas y similares, en las que se utilizan actualmente otras etiquetas de fluorescencia.

Las sondas con una región de doble hebra, que proporcionan sitios de intercalación y una región de hebra simple para permitir el reconocimiento por hibridación de secuencias diana específicas, ofrecen otro método para la generación de etiquetas fluorescentes versátiles. El desarrollo de condiciones que permiten una clara discriminación entre la unión de intercaladores con ácidos nucleicos de hebra simple y doble es un requisito previo esencial para el uso de dichas sondas.

Las sondas fluorescentes son reactivos valiosos para el análisis y separación de moléculas y células. Algunos ejemplos específicos de su aplicación son identificación y separación desde una sub-población de células en una mezcla de células a través de técnicas de fluorescencias, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia y microscopía de fluorescencia. Otras aplicaciones incluyen la determinación de una concentración de una sustancia o un miembro de un par de unión específico que se une a una segunda especie, o miembro del par de unión específico, v.g., reacciones antígeno-anticuerpo en un ensayo de inmunofluorescencia. Otra aplicación más es la localización de una sustancia en geles u otros soportes insolubles a través de técnicas de manchado de fluorescencia.

La selección de agentes de fluorescencia para estos propósitos se complica por diversas limitaciones: una radica en las características de absorción y emisión del agente de fluorescencia, ya que muchos ligandos, receptores y otros miembros del par de unión, así como otros materiales extraños asociados con la muestra, por ejemplo, sangre, orina y líquido cefalorraquídeo, auto-emiten fluorescencia e interfieren con una determinación o cuantificación precisa de la señal fluorescente generada por la etiqueta fluorescente cuando se expone la muestra al estímulo apropiado. Otra consideración es la eficiencia cuántica del agente fluorescente. Otro problema más es el auto-apagado; esto puede tener lugar cuando las moléculas fluorescentes interactúan entre sí cuando se encuentran en íntima proximidad. Un problema adicional es la unión no específica del agente de fluorescencia con los demás compuestos o incluso con el recipiente de ensayo.

Se ha demostrado que el ADNds forma complejos altamente fluorescentes con el bis-intercalador EthD. Las observaciones referentes a bis-intercalador EthD sugieren que el intercalador se puede explotar para generar una familia de complejos ADNds-colorante estables altamente fluorescentes con propiedades claramente distintas. Dichos complejos podrían explotarse por detección de multiplex de fragmentos de ADNds, así como muchas aplicaciones analíticas en las que se podrían utilizar fragmentos de ADNds apropiadamente diversificados etiquetados no covalentemente con diferentes colorantes como una familia única de sondas fluorescentes:



no obstante dicho compuesto puede tener la tendencia a auto-apagarse cuando está unido a ADN.

En los aparatos de citometría de flujo, se hace fluir las células u otras partículas en una corriente de flujo líquida de modo que se facilita la investigación de ciertas características de las mismas. En general, un aparato de citometría de flujo resulta útil para identificar la presencia de determinadas células o partículas de interés, enumerando las células o partículas y, en algunos casos, proporcionando una capacidad de clasificación de manera que se puede recoger las células o partículas de interés. En un aparato de citometría de flujo típico, se dirige una muestra de fluido que contiene

células a través del aparato en una corriente líquida en rápido movimiento de manera que cada una de las células pasa sucesivamente, y sustancialmente una cada vez, a través de la región sensora. Se puede determinar el volumen de células a través de los cambios en la impedancia eléctrica a medida que cada una de las células pasa a través de la región sensora. De manera similar, si se dirige un haz de luz incidente a la región sensora, las células que pasan se dispersan como la luz cuando pasan a través suyo. Esta luz dispersada ha servido como función del tamaño y forma de la célula, índice de refracción, opacidad, granularidad, rugosidad y similares. Por otra parte, la fluorescencia emitida por las células etiquetadas, o células autofluorescentes, que han sido excitadas como resultado del paso a través de la energía de excitación del haz de luz incidente, es detectable para la identificación de células que tienen propiedades fluorescentes. Después de realizar el análisis celular con un aparato de citometría de flujo, las células que han sido identificadas por tener las propiedades deseadas pueden clasificarse si el aparato ha sido diseñado con dicha capacidad.

Los instrumentos como son los aparatos de citometría de flujo son particularmente útiles para los investigadores y estudiosos que analizan las diversas respuestas, reacciones y funciones del sistema inmune. Los estudios de inmunofluorescencia, así como los inmunoensayos de fluorescencia, ayudan al investigador a identificar y seleccionar dirigidamente células de interés de manera que se puedan caracterizar apropiadamente estados patológicos, enfermedades y similares de forma apropiada. Además de las investigaciones del sistema inmune, los análisis de fluorescencia también son muy beneficiosos en las investigaciones de biología y morfología celular, incluyendo el estudio del sustrato de material celular.

Basándose en la fluorescencia para proporcionar datos e información sobre células, los mecanismos para realizar los ensayos para determinar la respuesta de fluorescencia es la principal consideración en el diseño del instrumento, así como los resultados obtenidos. Específicamente, los marcadores fluorescentes, ya sean dichos marcadores manchas fluorescentes o colorantes, son excitados típicamente por energía luminosa. Normalmente, existe una longitud de onda óptima que proporciona el máximo nivel de excitación para el marcador fluorocromático que se está utilizando. Una vez excitado, tiene lugar la emisión de fluorescencia típicamente a longitudes de onda diferentes de la longitud de onda de excitación. Los instrumentos de análisis de fluorescencia, ya sean microscopios de fluorescencia, analizadores de imagen o citómetros de flujo, están diseñados por lo general para detectar la emisión de fluorescencia a una longitud de onda de máxima emisión, en la que la señal de fluorescencia es la más fuerte.

Antes del descubrimiento y publicación de las utilidades de homodímero de etidio como un importante intercalador, el intercalador seleccionado habitual era bromuro de etidio. Los usos de intercaladores de bromuro de etidio incluyen metodologías fluorométricas, fluorescencias cuantitativas de ADN intercalado con bromuro de etidio sobre geles de agarosa, ensayo de placa de agarosa-bromuro de etidio o detección de análisis de ADN falso y similares. El bromuro de etidio y bromuro de propidio se utilizaban además en citometría de flujo, así como en aplicaciones para la representación de imagen electrónica directa, la cuantificación directa y rápida de fluorescencia y geles electroforéticos en la aplicación como ADN de mancha bromuro de etidio. El bromuro de etidio se ha utilizado también para aumentar la visibilidad de las líneas precipitantes y para confirmar la especificidad en metodologías de contrainmuno-electroforesis en dos etapas para la detección de anticuerpos anti-ADN o ADN en circulación participantes. La utilización de bromuro de etidio como intercalador en numerosos entornos, así como la utilización más reciente del intercalador homodímero de etidio están perfectamente documentados en la bibliografía y presentan lo más puntero en metodología y eficacia de intercalador.

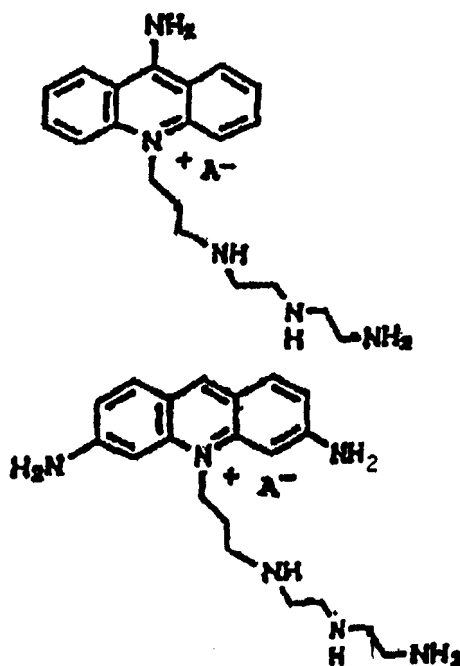
En una aplicación en cierto modo diferente de bromuro de etidio como agente de manchado, se ha unido el bromuro de etidio con un soporte sólido. En la patente EE.UU. N° 4.119.521 publicada para Chirikjian, el 10 de oct. de 1978, se describe un agente de intercalación de ADN fluorescente derivado de polisacáridos activados. Los derivados de la patente funcionan como manchas fluorescentes para proporcionar visualización directa del ADN y sus fracciones, con la excitación de la onda corta, radiación ultravioleta. Los agentes de intercalado utilizados en la patente son haluros de etidio, siendo el agente preferible bromuro de etidio. Se acopla covalentemente este agente con el polisacárido activado, como agarosa.

La utilización de bromuro de etidio como intercalador para su uso en numerosos entornos, así como la utilización más reciente del intercalador homodímero de etidio, están bien documentados en la bibliografía y representan lo más puntero en la metodología y eficiencia de intercaladores. No obstante, siempre queda una permanente necesidad de mejorar la utilización de los intercaladores y la viabilidad del uso de intercaladores con ADN, específicamente abordando (1) una alta afinidad para la unión de los intercaladores con la molécula de ADN; (2) reducción del auto-apagado, y (3) proporcionar una cinética de transporte superior. Los intercaladores que poseen estas cualidades reducen la cantidad de intercalador necesaria para realizar una de las muchas funciones que implican las metodologías antes mencionadas, lo que también puede mejorar las metodologías. Por otra parte, la mejora en la precisión y fiabilidad de los diferentes usos de interés no ha dejado de revestir interés.

Gaugain, B. y cols., Biochemistry, vol. 17, N° 24, 28 de noviembre 1978, páginas 5071-5078 describe la síntesis y las propiedades conformacionales de un homodímero de etidio y un heterodímero de acridina-etidinio. En WO 93/08165 se describen bis-intercaladores de ADN. En la patente EE.UU. N° 4.665.184 se describen intercaladores de ADN de metidio o etidio, ligados con ácido etilen diamina tetraacético. En la patente EE.UU. N° 5.312.921 y Benson, S.C. y cols., Nucleic Acids Research, 1993, vol. 21 N° 24 páginas 5720-5726 se describen intercaladores de ADN que tienen un fluoróforo unido a una cadena policatiónica de al menos dos cargas positivas.

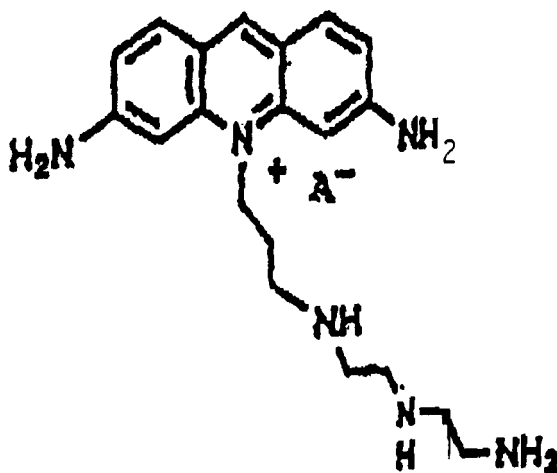
Resumen

La presente invención proporciona un compuesto representado por la fórmula:



en la que A^- es un contra anión monovalente aceptable.

La presente invención proporciona también un compuesto representado por la fórmula:



en la que A^- es un contra anión monovalente aceptable.

Los compuestos mencionados proporcionan una alta afinidad para la unión de la molécula de ADN y presentan un menor auto-apagado al mismo tiempo que proporcionan una cinética de transporte superior. Se ha observado que los intercaladores de la invención proporcionan una mejor fluorescencia cuando están unidos a una molécula de ADN dentro del entorno de citometría de flujo fluorescente, que es aproximadamente ocho a diez veces más brillante en fluorescencia, que el homodímero de etidio utilizado en el mismo entorno de citometría de flujo. Dada la mejora de la fluorescencia, la detección de hibridación de ADN puede llevarse a cabo utilizando concentraciones mucho más bajas de compuestos intercaladores de la presente invención que las utilizadas en el caso de los agentes de intercalado convencionales, como por ejemplo homodímero de etidio o bromuro de etidio. Utilizando concentraciones iguales, los compuestos intercaladores de la presente invención pueden detectar cantidades mucho menores de hibridación de ADN que los agentes de intercalado convencionales. Por lo tanto, los compuestos intercaladores de la presente invención son bastante más sensibles que los agentes de intercalado conocidos para detectar la hibridación de ADN.

Las mejoras en la citometría de flujo, ensayos de hibridación in situ de fluorescencia, electroforesis de gel, detección de ADN, inmunoensayo para ADN, y otros estudios de ADN son sustanciales. El uso de intercaladores con ADN y múltiples métodos han demostrado que el homodímero de etidio es más brillante en aproximadamente dos órdenes de magnitud que la metodología de manchado convencional, es decir, bromuro de etidio. No obstante, los compuestos intercaladores de acuerdo con la presente invención proporcionan por ejemplo, un colorante que presenta un aumento del brillo de ocho a diez veces mayor que el EthD en el mismo entorno, o una mejora aproximadamente mil veces mayor con respecto a las metodologías de manchado convencionales. Con la detección pre-manchado y post-electroforesis, el nivel de sensibilidad de la detección por radioinmunoensayo de ADN se puede conseguir ahora con fluoróforos. Las composiciones de compuesto que proporciona la presente invención extienden los límites de detección hasta diez veces más en relación con EthD, proporcionando así nuevos usos potenciales en aplicaciones de intercaladores para el estudio de análisis de ADN, así como aplicaciones terapéuticas y similares.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una imagen de FACScan™ de dispersión lateral frente a dispersión directa.

La figura 2 es un histograma de intensidad de fluorescencia (abscisas) frente a la frecuencia de eventos (ordenadas);

La figura 3 es una representación del diagrama de dispersión para una dispersión lateral (SSC en abscisas) frente a la intensidad de fluorescencia (ordenadas);

La figura 4 es una imagen de FACScan™ para dispersión lateral frente a dispersión directa;

La figura 5 es un histograma de intensidad de fluorescencia (abscisas) frente a la frecuencia de eventos (ordenadas);

La figura 6 es una representación del diagrama de dispersión para dispersión lateral (SSC en abscisas) frente a la intensidad de fluorescencia (ordenadas);

La figura 7 es una representación fotográfica de una electroforesis de gel de agarosa irradiado con luz UV realizada sobre ADN de plásmido PBR322 mellado con enzima BAMH;

La figura 8 es un gráfico de saturación de hibridación para equivalentes;

La figura 9 presenta las curvas de valoración de la hibridación para intensidad de fluorescencia frente a equivalentes;

La figura 10A es una imagen FACScan™ (SSC frente FSC) de una distribución típica de globulos blancos lisados;

La figura 10B es una imagen FACScan™ de la misma muestra de sangre que la figura 10A en la que se han añadido núcleos de eritrocito de pollo sin manchar ("CEN");

La figura 10C es una imagen de FACScan™ de la misma muestra lisada con diluyente de glóbulos blancos de la sangre ("WBC DIL");

La figura 10D es una imagen FACScan™ de la misma muestra que la presentada en la figura 10C, pero con CEN;

La figura 10E es una imagen FACScan™ de la misma muestra lisada en el mismo diluyente que el de la figura 10D, pero con 0,5 µg/ml de colorante de glóbulos rojos de la sangre nucleados ("NRBC");

La figura 10F es una imagen FACScan™ de la misma muestra lisada en el mismo diluyente que el de la figura 10D, pero con 0,25 µg/ml de colorante NRBC;

La figura 11 es una representación gráfica de la eficiencia de captura de ADN de plásmido mellado con enzima de restricción radioetiquetado con 32P, en micropartículas de poliestireno activadas con fenatridinio preparadas tal como se describe en el ejemplo 6;

La figura 12 es una representación gráfica de la eficiencia de la captura de ADN de plásmido radioetiquetado con 32P en perlas de sefarosa de carboximetilo activadas con fenatridinio sintetizadas tal como se describe en el ejemplo 6.

La figura 13 es un esquema de reacción para la síntesis del compuesto 24 y sus precursores;

La figura 14 es una representación esquemática de micropartícula en fase sólida derivatizada de intercalador.

La figura 15 es un esquema de reacción para la síntesis del compuesto 85 y sus precursores;

La figura 16 es un esquema de reacción para la síntesis del compuesto 90 y sus precursores;

La figura 17 es una comparación entre las intensidades de fluorescencia relativas obtenidas del ADN manchado con el compuesto 24, bromuro de etidio, yoduro de propidio y homodímero de etidio.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a los compuestos intercaladores que se han descrito que tienen alta afinidad para la unión con la molécula de ADN. Dichos compuestos intercaladores presentan una mejor unión con la molécula de ADN dentro de las metodologías conocidas que requieren inserción de intercalador en la molécula de ADN. La mejor unión de las moléculas de ADN mediante un segmento que funciona como intercalador es útil en el etiquetado, captura, inserción terapéutica, ensayo y similares, con un mejor rendimiento del intercalador gracias a la mejor eficiencia de utilización de los compuestos. Se consigue una mejor unión con la molécula de ADN de los intercaladores mencionados de manera que los intercaladores presentan una alta afinidad para la unión, un menor auto-apagado y una cinética de transporte superior, especialmente, en comparación con el homodímero de etidio u otros bis-intercaladores.

La síntesis de los compuestos intercaladores y la utilización de dichos compuestos se muestra en las figuras 1-9, 10A-10F; 11-17. La información que se muestra en estas figuras demuestra claramente la alta afinidad de unión, el menor auto-apagado, y una cinética de transporte superior, especialmente en comparación con el homodímero de etidio u otros bis-intercaladores. Los compuestos de la invención son compuestos 85 y 90.

La figura 1 es una imagen FACScan™ de la dispersión lateral frente a la dispersión frontal (SSC en el eje de las abscisas y FSC en el eje de las ordenadas) para una distribución típica de glóbulos blancos lisados con diluyente WBC DIL con colorante de NRBC fenantridinio triamina (PTA) 24 y CEN. Los umbrales cuadrantes fueron establecidos para excluir los linfocitos separados en el gráfico de la SSC frente a la FSC

La figura 2 es un histograma de la intensidad de fluorescencia (abscisas) frente a la frecuencia de eventos (ordenadas) para poblaciones de células manchadas y sin manchar en presencia de fenantridinio triamina (PTA) 24.

La figura 3 es una representación del diagrama de dispersión para la dispersión lateral (SSC en las abscisas) frente a la intensidad de fluorescencia (ordenadas) que presenta la separación de células manchadas con PTA 24 (esquina superior izquierda, cuadrante NW) desde células sin manchar (resto) mediante intensidad de fluorescencia.

La figura 4 es una imagen FACScan™ de la dispersión lateral frente a la dispersión frontal (SSC en el eje de las abscisas y FSC en el eje de las ordenadas) para una distribución típica de los glóbulos blancos lisados con diluyente WBC DIL con colorante NRBC homodímero de etidinio y CEN. Se establecieron los umbrales de cuadrante para excluir los linfocitos seleccionados en el gráfico de puntos de SSC frente a FSC:

La figura 5 es un histograma de la intensidad de fluorescencia (abscisas) frente a la frecuencia de eventos (ordenadas) para poblaciones de células manchadas y sin manchar en presencia de homodímero de etidio.

La figura 6 es una representación del diagrama de dispersión para la dispersión lateral (SSC en las abscisas) frente a la intensidad de fluorescencia (ordenadas) que representa la separación de células manchadas con homodímero de etidio (esquina superior izquierda, cuadrante NW) de las células sin manchar (el resto) según la intensidad de fluorescencia.

La figura 7 es una representación fotográfica de una electroforesis de gel de agarosa irradiado con luz UV realizado en ADN de plásmido PBR322 mellado con BAMH. Se realizaron cargas de 5 µl de soluciones de reserva para las vías 3-14. Se utilizaron las siguientes soluciones de reserva en ADN e intercalador para las carriles de carga 1-14. Carril 1: marcador; carril 2: blanco; carril 3: 20 ng/ml de plásmido manchado con bromuro de etidio; carril 5: 160 pg/ml de plásmido manchado con bromuro de etidio; carril 6: 40 pg/ml de plásmido manchado con bromuro de etidio; carril 7: 20 ng/ml plásmido manchado con homodímero de etidio; carril 8: 800 pg/ml de plásmido manchado con homodímero de etidio; carril 9: 160 pg/ml de plásmido manchado con homodímero de etidio; carril 10: 40 pg/ml de plásmido manchado con homodímero de etidio; carril 11: 20 ng/ml de plásmido manchado con PTA 24; carril 12: 800 pg/ml de plásmido manchado con PTA 24; carril 13: 160 pg/ml de plásmido manchado con PTA 24; carril 14: 40 pg/ml de plásmido manchado con PTA 24. En todos los casos, la relación de colorante/par de base fue 1/20. En todos los casos, se incubó previamente el colorante con el ADN y no se realizó ningún manchado posterior a electroforesis de gel.

La figura 8 es un gráfico de saturación de hibridación para los equivalentes de d(pT)9 que se añaden a d(pA)9 a ADN 6,6 micromolar y colorante 3,08 micromolar para homodímero de etidinio y PTA 24, en una proporción 1:4 de colorante par de base. La representación gráfica de los equivalentes de oligonucleótido complementario d(pT)9 en el eje de las abscisas añadido a d(pA)9 frente a la intensidad de fluorescencia relativa en el eje de las ordenadas generado aplicando el protocolo descrito en el ejemplo 2 para comparar homodímero de etidio y PTA 24. La concentración de fluoróforo en ambos casos fue de 3,08 micromolar utilizando una corrección estadística dos veces mayor para los equivalentes 2,0 moles de la fracción de fenantridinio por cada mol de homodímero de etidinio. Ambas curvas están normalizadas con el fondo para fluorescencia relativa. La excitación fue 488 nm (534 nm es el máximo de excitación) para este experimento y la emisión fue 625 nm.

La figura 9 presenta las curvas de valoración de hibridación para la intensidad de fluorescencia frente a los equivalentes de d(pT)9 añadidos a d(pA)9 a ADN 6,6 micromolar y bromuro de etidio 3,08 micromolar y PTA 24. La representación gráfica de los equivalentes de oligonucleótido complementario d(pT)9 en las abscisas frente a la inten-

sidad de fluorescencia relativa (ordenadas) fue generada utilizando el protocolo descrito en el ejemplo 2 para comparar bromuro de etidio y PTA 24. La concentración del fluoróforo en ambos casos fue 3,08 micromolar. Ambas curvas se normalizan con el fondo. La excitación fue a 488 nm (534 nm es la excitación máxima) y la emisión fue 625 nm y se midieron las intensidades utilizando un fluorímetro Hitachi F-3010.

La figura 10A es una imagen FACScan™ (SSC frente a FSC) de una distribución típica de glóbulos blancos lisados con CD4000 WBC DIL sin colorante de NRBC o CEN. Los umbrales de cuadrante fueron establecidos para excluir los linfocitos separados en el gráfico de puntos de SSC frente a FSC.

La figura 10B es una imagen FACScan™ de la misma muestra de sangre que la figura 10A con adición de CEN sin manchar. Tal como se puede ver, CEN sin manchar demuestra cierta auto-fluorescencia de FRL3. Se estableció la región 1 para que incluyera todos los eventos FL3+ en esta muestra sin manchar, de manera que las células manchadas en las muestras de ensayo pudieran contarse en la región 2. Se ajusta la región 3 para que incluya la población CEN solamente para medir la FL3 media de la población.

La figura 10C es una imagen FACScan™ de la misma muestra lisada con WBC DIL que contiene 1,0 ug/ml de colorante de NRBC. Se detectó un 13% de los eventos FL2+ en μ l desde los linfocitos separados y 1,08% de eventos FL3+ de una población total de glóbulos blancos no seleccionados.

La figura 10D es una imagen FACScan™ de la misma muestra que la presentada en la figura 10C, pero con CEN. La región 2 del histograma FL3 de la población no seleccionada muestra la población CEN manchada que tiene la FL3 media de 3319,8.

La figura 10E es una imagen FACScan™ de la misma muestra lisada en el mismo diluyente que la figura 10D, pero con 0,5 ug/ml de colorante NRBC.

La figura 10F es una imagen FACScan™ de la misma muestra lisada en el mismo diluyente que la figura 10D, pero con 0,25 ug/ml de colorante NRBC. Tal como se puede observar, el CEN manchado sigue estando perfectamente separado de los glóbulos blancos.

La figura 11 es una representación gráfica de la eficacia de captura de ADN de plásmido radioetiquetado con 32P en micropartículas de poliestireno activadas con fenatridinio sintetizadas tal como se describe en el ejemplo 6: A: recuentos radioactivos iniciales en solución que da cuenta de la concentración de ADN total; B: recuento radioactivo que queda en la solución tras la separación de ADN por centrifugado tal como se describe en el ejemplo 6; C: recuento radioactivo inicial en el ADN unido a la micropartícula a través de la fracción fentridina antes de que se inicie la liberación mediante NaOH; y D: recuento radioactivo que queda en el sólido tras la separación de ADN con NaOH.

La figura 12 es una representación gráfica de la eficiencia de la captura de ADN de plásmido radioetiquetado con 32P sobre perlas de sefarosa de carboximetilo activadas con fenatridinio sintetizadas tal como se describe en el ejemplo 6. A: recuento radioactivo inicial en solución que da cuenta de la concentración de ADN total; B: recuento radioactivo que queda en la solución tras la eliminación de ADN por centrifugado tal como se describe en el ejemplo 6; C: recuento radioactivo inicial en el ADN unido a la micropartícula mediante la fracción de fentridina antes de que se inicie la liberación mediante NaOH; y D: recuento radioactivo que queda en el sólido tras la eliminación de ADN con NaOH.

Los compuestos intercaladores de la presente invención son monointercaladores sustancialmente, frente a los (bis) intercaladores polifuncionales.

En los siguientes ejemplos, solamente los compuestos 85 y 90 son compuestos intercaladores con arreglo a la invención. Los ejemplos que se refieren al compuesto 24 se presentan únicamente para ilustrar la preparación y uso de compuestos intercaladores.

Ejemplo 1

Síntesis de fenatridinio Triamina (PTA) 24 y productos intermedios precursores 20-23

Se sintetizó PTA 24 a través de la secuencia que se muestra en el esquema de la figura 13 (los procedimientos experimentales utilizados para obtener el producto 24 son como se ilustran aquí).

Producto intermedio 21: Se obtuvo el producto intermedio de partida 20, 3,8-diamino-6-fenil fenatridina (25,0 g, 0,0876 moles) de Aldrich Chemical Company (Milwaukee WI) y se añadió a un matraz de una sola boca, de 3,0 litros de capacidad y fondo redondo, bajo argon, equipado con una varilla de agitación magnética y un condensador de reflujo. Se añadió a este recipiente, sin dejar de agitar 1,0 litros de piridina deshidratada. Se continuó agitando la suspensión resultante durante 15 minutos hasta que se disolvió el sólido. Se añadió una cantidad catalítica de N,N-dimetilamino-piridina (1,07 g, 0,0086 moles) a esta solución sin dejar de agitar. A continuación se añadió anhídrido acético (462 g, 4,9 moles) y se sometió a reflujo la mezcla de reacción resultante durante 8 a 12 horas. A continuación, se dejó enfriar la mezcla de reacción y se eliminó el disolvente al vacío. Para la purificación del producto II, se llevó a cabo un gradiente de columna sobre gel de sílice utilizando 2,0 litros de 45/40/10/5 de acetato de etilo/hexano/CH₂Cl₂/CH₃OH seguido de 1,0 litros de 40/40/10/10 EtOAc/hexano/CH₂Cl₂/CH₃OH. Se recogieron las fracciones de 10,0 ml y se combinaron las fracciones apropiadas y se separó el disolvente al vacío. A continuación se disolvió el residuo de tipo

ES 2 331 813 T3

goma pegajoso en EtOH caliente (220 ml) y se hizo precipitar por enfriado a 0°C. Se eliminó por decantación el licor madre y se añadieron 200 ml de EtOH nuevo. Se volvió a disolver el sólido por calentamiento y se dejó cristalizar a -4°C durante 48 horas. Se recogieron los cristales del licor madre y de la segunda recrystalización y se lavaron con una pequeña cantidad de EtOH frío y se secaron con alto nivel de vacío durante varias horas. El rendimiento del producto bruto aislado tras la cromatografía de columna y las dos recrystalizaciones fue 32%. ¹H RMN CD₃OD (300 MHz) 9,1 (d, 1H, 8,82 Hz), 9,0 (d, 1H, 8,75 Hz), 8,08 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,92 (d, 1H, 4,5 Hz), 7,8 (m, 3H), 7,65 (m, 3H), 2,45 (s, 6H), 2,35 (s, 6H); ¹³C RMN CD₃OD (75,45 MHz), 174,5, 163,7, 145,3, 142,1, 140,6, 139,9, 134,4, 133,8, 130,8, 130,6, 129,8, 127,3, 125,9, 125,6, 124,8, 27,1. Masa exacta calculada para C₂₇H₂₃N₃O₄: calculada 453,1688 masa exacta observada: 453,1683; CH Análisis calculado para C₂₇H₂₃N₃O₄: C, 71,51; H 5,11; N: 9,27; Encontrado C: 71,77; H: 5,10; N: 9,20.

Producto intermedio 22: Se sintetizó el producto intermedio 22 a partir de la diamida 21 modificando un procedimiento de la bibliografía (Gaugain y cols., Biochemistry, vol. 17 N° 24, 1978, pp. 5071-5078) para la cuaternización de la diamida de 3,8 -diamino-6-fenil fenantridina. Se colocó diamida 21 (10,5 g, 0,023 mmoles) en un matraz de fondo redondo de 2,0 litros de capacidad bajo argón, equipado con una varilla de agitación magnética y un condensador de reflujo. Se añadió 1,3-dibromopropano (1,0 litros, 9,86 moles) a este matraz y se llevó a reflujo la mezcla resultante durante 7 horas. Se enfrió la solución durante toda la noche y se filtró el producto precipitado y se lavó con éter dietílico. Se obtuvieron 10,44 g (68,7%) de material en bruto 22. Se recrystalizó este material en CH₃OH para producir 5,3 g de bromuro de diacetilo 22. ¹HRMN CD₃OD (300 MHz) δ 10,75(s, 1H), 10,45 (s, 1H), 9,3 (s, 1H), 9,09 (d, 9,2 Hz, 1H), 9,04 (d, 9,2 Hz, 1H), 8,45 (d, 9,1 Hz, 2,2 Hz, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,07 (d, 9,0 Hz, 1H), 7,95 (m, 3H), 7,85 (m, 3H), 5,0 (t, 9,0 Hz, 3H), 3,6 (t, 6,0 Hz, 2H), 2,65, 2,38, 7,75 ¹³C RMN ₂₅DMSO [δ ???] (75,45 MHz) δ 169,9, 169,3, 163,8, 142,1, 139,9, 134,2, 131,5, 130,5, 129,5, 128,4, 125,9, 125,4, 123,6, 122,3, 121,6, 119,0, 107,7, 55,7, 30,7, 24,5, 24,2; masa exacta calculada para C₂₆H₂₉N₃O₂Br₂ sal libre (BAR+) 490,1131 Observado: 490,1139; Análisis CH calculado para C₂₆H₂₉N₃O₂Br₂ H: 4,41; C: 54,66 N:7,36 Encontrado H: 4,25 C:54,65 N:7,30.

Producto intermedio 23: Se añadió el producto intermedio 22 (5,3 g, 0,0093 moles) a un matraz de fondo redondo de 250 ml de capacidad equipado con una varilla de agitación magnética y un condensador de reflujo. A continuación, se añadió metanol (150 ml) a este matraz al mismo tiempo que se agitaba bajo nitrógeno y se añadió dietileno triamina (29,2 g, 0,283 moles) al mismo tiempo que se seguía agitando. Se calentó a reflujo la solución transparente resultante durante toda la noche a reflujo, bajo nitrógeno. A continuación, se dejó enfriar esta solución a temperatura ambiente y se vertió en H₂O destilada. A continuación, se concentró esta mezcla al vacío hasta que sólo quedó H₂O. Se añadieron de 50 a 75 ml más de H₂O y se dejó enfriar la solución a 0°C. A continuación, se filtró el sólido y se lavó con agua enfriada con hielo. A continuación, se volvió a disolver este material en EtOH y se hizo precipitar con HCl 10N. Tras la filtración de la suspensión, se recrystalizó el sólido resultante en etanol caliente con enfriado a 0°C durante 15 minutos. Se recogió también una segunda cosecha del segundo filtrado tras el reposo y por precipitación con EtOH desde el primer filtrado. A continuación se combinaron estos sólidos y se obtuvo el producto final 23 (2,5 g) tras un alto nivel de vacío durante toda la noche. ¹H RMN CD₃OD (300 MHz) δ 9,2 (s, 1H), 9,05 (d, 1H), 8,95 (d, 1H), 8,4 (ancho s, 2H), 8,3 (ancho s, 1H), 7,9 (ancho m, 3H), 7,7 (ancho m, 2H), 5,1 (ancho m, 1H), 3,9 (ancho s, 3H), 3,45 (ancho m, 2H), 3,85 (ancho m, 2H), 2,5 (ancho, 3H) (ancho m, 3H); EM Calculado para la sal libre C₃₀H₃₇N₆O₂ (BAR+) 513 observado: 513.

Producto 24: Se llevó a cabo la síntesis y purificación de fenantidinio triamina, PTA, 24 siguiendo el siguiente protocolo. Se disolvió triamina 23 (2,35 g, 0,0036 moles) en 75,0 ml de metanol y se añadieron 75 ml de HCl 4N. Se sometió a reflujo la mezcla durante 2 horas y se dejó enfriar. Se añadió etanol a esta solución y se filtró el precipitado resultante y se lavó con una cantidad mínima de etanol frío. Se reconcentró el filtrado y se añadió etanol nuevo y HCl acuoso concentrado. Se filtró el precipitado resultante también. A continuación, se concentró este filtrado hasta casi la sequedad y se añadió Et₂O y se eliminó por filtración el sólido. A continuación, se disolvió el último residuo que no se pudo filtrar restante en HCl concentrado y se hizo precipitar con EtOH. Se filtró este material y se lavó con etanol, se combinaron todos los materiales sólidos de la secuencia anterior y se sometió este material a alto vacío durante toda la noche para obtener 2,03 g en total de PTA 24 de mancha de ADN fluorescente de alta afinidad. ¹H RMN d₆-DMSO (300 MHz) δ 10,0 (ancho s, 2H), 9,65 (ancho s, 2H), 8,68 (d, 14,2 Hz, 2H), 8,35 (ancho s, 2H), 7,75 (m, 4H), 7,65 (s, 1H), 7,55 (d, 9,2 Hz, 2H), 7,35 (d, 9,2 Hz, 2H), 7,35 (d, 9,2 Hz, 2H), 6,28 (s, 1H), 4,5 (ancho s, 2H), 4,0 (ancho s, 8H), 3,4 (ancho s, 2H), 3,0 (ancho s, 2H), 2,3 (ancho m, 2H); ¹³C RMN d₆-DMSO (75,45 MHz) δ 159,7, 151,1, 134,6, 131,7, 130,9, 129,4, 128,8, 128,4, 124,9, 122,9, 120,1, 117,4, 99,6, 51,4, 43,8, 42,5, 40,3, 34,9, 18,5; Espectro de masa de alta resolución. C₂₆H₃₂N₆ (BAR+) Calculado 429,2767, observado 429,2766; análisis CH calculado para C₂₆H₃₇N₆C₁₄·3H₂O fue H 6,89; C: 49,61; N: 13,35 Encontrado H: 6,16; C: 49,74 N: 13,08.

Ejemplo 2

60 Ensayo de hibridación

Se utilizó PTA 24 para determinar cuantitativamente la hibridación cuando se valoró un oligonucleótido diana con su socio complementario. En la figura 9 se puede encontrar una comparación del manchado con bromnuro de etidio frente a PTA 24 para la detección de esta hibridación, en lo que se refiere al siguiente protocolo, y en la figura 8 se puede encontrar la comparación de homodímero de etidio frente a PTA 24 en cuanto al siguiente protocolo. Se obtuvieron hebras complementarias de ADN (ácido oligodesoxitimidílico, d(pT)9 y ácido oligodesoxiadenílico (d(pA)9) de Sigma Chemical Co. en SL Louis, MO. Se obtuvo una solución de reserva de d(pA)9 a 5 unidades/ml de Tris 0,05

ES 2 331 813 T3

M, NaCl 0,2N, EDTA 1 MM, pH 8,4. Para polyA, $\varepsilon = 8,4 \text{ AU/mM cm}$ o $8.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; por lo tanto, con 9 pares de base para d(pA)9, la ε es $75.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A continuación, se diluyó esta solución de reserva para obtener una solución de reserva a $6,61 \times 10^{-6} \text{ M}$ o $6,6 \mu\text{M}$. Se obtuvo la solución de reserva de d(Pt)p a 25 unidades/5,0 ml y se utilizó para valoración sin posterior dilución en el mismo tampón. Dado que ε para polyT es $8,15 \text{ AU/mM cm}$ o $8.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ por par de base, o $73.350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ por oligo, la concentración de la solución de reserva de oligo fue $68 \mu\text{M}$ en moléculas de ADN. Se realizó una valoración utilizando un espectrofotómetro de fluorimetría F-4010- de Hitachi equipado con microcélulas de 0,5 ml para obtener espectros totalmente corregidos y una longitud de onda de excitación de 488-550 nm (óptima en torno a 534) y una longitud de onda de emisión de 600-650 (óptima en torno a 625). Se añadieron equivalentes de d(pT)9 a los siguientes incrementos: 0,02, 0,05, 0,080, 0,150, 0,300, 0,500, 0,700, 1,00, 2,00, 5,00 equivalentes. Se preparó cada una de las muestras en la curva de valoración individualmente dividiendo la solución de reserva de d(pA)9 inicial por partes alícuotas de $10 \times 1,0 \text{ ml}$. Se llevó a cabo la adición del complemento por micropipeteado de una cantidad apropiada (2, 5, 8, 15, 30, 50, 70, 100, 200, y $500 \mu\text{l}$, respectivamente) de solución de reserva de d(pT)9 a cada una de una serie de 10 partes alícuotas. Se incubó cada parte alícuota obteniendo progresivamente relaciones molares más grandes de las dos hebras complementarias, a temperatura ambiente, durante 15 minutos, se añadió el colorante como partes alícuotas de $20,0 \mu\text{l}$ de una solución $154 \mu\text{M}$ del colorante en TRIS 0,05 M, NaCl 0,2 N, EDTA 1mM, tampón pH 8,4. Esto corresponde a una relación colorante/par de base ADN de 1/20 en saturación con oligo complementario. Las concentraciones generales del colorante y oligo varían en el gráfico de saturación debido al uso de adiciones de diferentes incrementos de la misma solución de reserva. Una vez transcurrido un tiempo de incubación de 15 minutos adicional, se realizó la lectura de la intensidad de fluorescencia relativa a 625 nm y se registró para generar una curva patrón que es directamente proporcional a la cantidad de hibridación de ADNds o secuencia diana, en estas condiciones. A continuación se sustrae la fluorescencia de fondo, o la fluorescencia residual inicial, como una constante para todas las curvas para comparar las diferentes curvas de valoración en el mismo gráfico.

Ejemplo 3

Aplicación de electroforesis de gel

Se corrió un gel de agarosa para comparar la intensidad de manchado de bromuro de etidio (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI), homodímero de etidio-I (Molecular Probes, Cat. # E 1169, Eugene, Oregon) y mancha PTA 24. Se incubó el plásmido pBR322 a 2,1 mg en 7 ml de solución de reserva a 37°C durante 1 hora con q ml de enzima de restricción BAMH con 2 ml de 10x tampón React 2 y se diluyó a un total de 20 ml con 10 ml de H_2O . A continuación, se utilizó la mezcla para preparar 3 soluciones de reserva de plásmido pBR322 mellado a 0,63 mg por cada 6 ml para cada vial. Se volvieron a diluir estas reservas con H_2O y un 20% de glicerol hasta obtener soluciones de reserva de ADN finales de 20 ng/ml, 800 pg/ml, 160 pg/ml y 40 pg/ml con una relación 1:4 de colorante a pares de base de ADN en cada uno para un total de 12 soluciones de reserva. Se cargó una parte alícuota de 5 ml de cada reserva en 12 carriles por separado en agarosa y se puso en marcha la electroforesis durante 30 minutos en TRIS 4mM, pH 8,2, con tampón EDTA 0,01 mM. A continuación se eliminó el gel y se fotografió tras su exposición a luz U.V. en una caja de gel convencional.

Ejemplo 4

Protocolo para la síntesis de reactivo de captura de micropartícula de carboximetil estireno activada con intercalador

Se llevó a cabo la síntesis de un reactivo de captura de micropartícula (MP) en fase sólida derivatizado de intercalador a través del esquema representado a continuación y se llevó a cabo según el siguiente procedimiento.

Se colocaron 45 partes alícuotas de micropartículas de $0,275 \pm \mu\text{m}$ (Seradyne, Indianapolis, IN) en un vial de 4 ml y se hizo un intercambio de tensioactivo utilizando una resina de lecho mixta de intercambio iónico Bio-Rex 501-D (Bio-Rad, Richmond, CA). Después de una agitación suave durante 2 horas, se filtró la resina desde la mezcla utilizando un embudo de vidrio sinterizado tosco equipado con una cámara de recolección de presión reducida. Se diluyó la muestra a una concentración de MP de 10% de sólidos en peso. Se calculó la cantidad total de equivalentes de ácido carboxílico radioactivo de las especificaciones de valoración del vendedor.

Se obtuvo una solución de reserva de sulfo N-hidroxisuccinimida (Pierce, Rockford, IL) a 11 mg/ml (20 mM) en H_2O y se obtuvo una solución de reserva de EDAC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 10 mg/ml (5 mM) en H_2O . Se añadieron cinco equivalentes de EDAC ($290 \mu\text{l}$ de reserva) a la mezcla de reacción de micropartículas de carboxi, seguido de 5,0 equivalentes de sulfo N-hidroxisuccinimida ($330 \mu\text{l}$ de solución de reserva). Se dejó incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas y después se añadieron 2,0 equivalentes molares de PTA 24 (4 mg) a una concentración de $8 \text{ mg}/400 \mu\text{l}$, o $2,0 \text{ mg}/100 \mu\text{l}$ en NaCl 0,1N, pH 8,0, tampón Pi fosfato 0,1N. Se puede sustituir sulfo N-hidroxisuccinamida por N-hidroxisuccinamida (Pierce) si se disuelve primero en una solución de reserva de DMF (dimetil formamida) y se reparte por partes alícuotas tal como se ha descrito anteriormente. Después de dejar 24 horas de completa reacción, se separó el colorante libre por centrifugado, se separó del licor madre y se resuspendió varias veces hasta que la solución quedó transparente y no se extrajo más colorante de las muestras. A continuación, se diluyó el reactivo de captura purificado a una solución de reserva de 2-4% de sólidos en H_2O .

En la figura 14 se ofrece una representación esquemática general de este ejemplo.

ES 2 331 813 T3

Ejemplo 5

Captura de ADN en fase sólida

5 Se obtuvo sefarosa CM (modificada con carboxi) de Stigma Chemical Co. (St. Louis, MO) en una mezcla de etanol/H₂O. Se estimó la solución en un 50% de sólidos en función del volumen total ocupado por las porciones sólida y líquida en reposo prolongado. A continuación, se mezcló esta suspensión uniformemente y se diluyó a un 10% de sólidos. Se separaron 200 μ l de esta solución de reserva y se calculó a 0,12 mq/gramo como 0,012 meq de total de ácido. Se preparó la solución de reserva de EDAC y N-hidroxisuccinimida y se añadieron 5,0 equivalentes de cada
10 reactivo de activación a esta suspensión. Para esta preparación, se utilizaron 13,2 mg (en 1,32 ml) de HOSuc y 11,25 mg de EDAC (en 1,02 ml) y 8,0 mg en total del intercalador PTA 24. Tras la incubación durante 2-24 horas, se limpió la suspensión con un lavado repetido y etapas de centrifugado suave hasta que no se eliminó más color del sólido tras la dilución. Se preparó una reserva a 10% de sólidos en H₂O. Debe advertirse que se pusieron en marcha controles con PTA24 modificado y fases sólidas no modificadas y se produjo una captura no específica mínima de ADN con los
15 materiales sin derivatizar.

Ejemplo 6

Protocolo para captura de ADN mediante fase sólida modificada con intercalador

1. Colocar 50 μ l de micropartículas activadas en un eppendorf de 1,5 ml.
2. Añadir 150 μ l de PBS y 1-20 u de un plásmido linealizado de 5,0 kb etiquetado en el extremo con ³²P. Alternativamente, añadir 1-50 μ l de muestra biológica u otro ADN purificado.
3. Mezclar por rotación durante una hora a temperatura ambiente.
4. Formar un aglomerado de las micropartículas por centrifugado a 5.000 rpm durante 5 minutos.
5. Lavar una o dos veces con 200 μ l de PBS.
6. Liberar el ADN por adición de 50 μ l de 0,5 M de NaOH y mezclar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar y recoger el sobrenadante, que contiene ADN liberado.

Se midió la eficiencia de la captura de ADN utilizando ADN de plásmido radioetiquetado con ³²P siguiendo el protocolo anterior. En la figura 11 se encuentran los resultados utilizando las micropartículas de poliestireno modificadas con intercalador, en lo que se refiere al ejemplo 4 y la figura 12 y utilizando perlas de sefarosa CM modificadas con intercalador preparadas en lo que se refiere al ejemplo 5. Los datos indican que la unión de ADN con la fase sólida modificada con intercalador fue específica e inducida por la unión covalente del intercalador 24 con la fase sólida.

Ejemplo 7

Intensidades de manchado relativas de homodímero de etidio y fenantridinio triamina 24 en un estudio citométrico de flujo de núcleos de eritrocito de pollo (CEN)

50 Protocolo: Se añadieron 50 μ l de la muestra de sangre completa de dos donantes internos y 3 μ l de suspensión CEN a 1,0 ml de WBC DIL pre-calentada a 40°C sin colorante NRBC y con él a una concentración de 1 μ g/ml, se mezcló y se introdujo en el FACScan™ y se obtuvieron lecturas de 20". Se utilizaron núcleos de eritrocito de pollo (CEN) para medir el brillo del manchado FL3 (media FL3 de CEN). Las muestras de sangre completa utilizadas tenían de aproximadamente 4 a 5 horas. En las figuras 1 a 6 se muestran los datos de este experimento.

55

Ejemplo 8

Comparación de comportamientos de concentraciones menores de colorante fenantidinio triamina 24 en relación con homodímero de etidio

60 Se demostró el efecto de la reducción de la concentración de colorante PTA 24 (Figuras 10A-F) en relación con el homodímero de etidio del siguiente modo.

65 *Método:* Se diseñó el experimento para demostrar la correlación entre la concentración de colorante y el porcentaje de eventos FL2+ en el cuadrante UL del gráfico de puntos de FL1 frente a FL2. La WBC DIL utilizada contenía 0,5% peso/volumen de cloruro de amonio, 0,075% de volumen de formaldehído, 0,01% de peso/volumen de saponina, 0,01% peso/volumen de bicarbonato potásico, y 20 mM de tampón acetato con un pH de aproximadamente 6,0 y una

osmolalidad de aproximadamente 270 mOsm por litro.

Se añadieron 50 μ l de muestra de sangre completa de cada uno de los dos donantes internos a 1,0 ml de WBC DIL calentada previamente a 40°C sin adición y con adición de colorante NRBC de diversas concentraciones (0,25, 0,50, 0,75 y 1,0 μ g/ml), se mezcló y se introdujo en el FACSscan™ y se obtuvieron lecturas de 20". Se utilizó la suspensión de núcleos de eritrocito de pollo (CEN) para medir el brillo del manchado FL3 (FL3 media de CEN). Las muestras de sangre completa utilizadas para este experimento tenían aproximadamente 6 horas.

Se observó que el ADN de CEN es esencialmente indistinguible del fondo sin PTA 24 (figura 10B) y que se puede reducir la concentración del colorante a 75% de la del homodímero de etidio (figura 5) y seguir manteniendo una separación del fondo aceptable (figura 10F). Dicha reducción puede conducir a una unión no específica significativamente menor y a un ahorro sustancial del uso de colorante.

Ejemplo 9

Colorantes de viabilidad en el citómetro de flujo Coulter Elite™

Protocolo de aislamiento de células: Se trató cada tubo de las células aisladas ficol del siguiente modo: PBS con 0,1% de NaAzida y 1,0% de albúmina (Sigma catálogo #1000-3) peso específico Ficol 1,119 (Sigma Histopague catálogo #1119-1).

Se diluyeron 10 ml de sangre completa (anticoagulante EDTA) con 10 ml de PBSW. Se estratificaron en 4 tubos de 15 ml de fondo cónico, 5 ml de sangre diluida sobre 5 ml de ficol. Se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a 400 x G. Se aspiró la capa de interfaz que contiene los linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas y se lavó una vez en 15 ml de PBS, por centrifugado de los tubos a 300 x G durante 6 minutos. Se resuspendió el aglomerado de células en PBS, se hizo el recuento de las células y se ajustó a 8,5 x 10⁶ células por ml.

Manchado de células: Protocolo

Soluciones de colorante

PTA 24 - solución de reserva 10 μ g/ml obtenida por disolución de PTA 24 en PBS con 0,1% de NaAzida.

Yoduro de propidio (P.I). Solución de reserva 0,5 mg/ml obtenida por disolución de P.I en PBS con 0,1% de NaAzida.

Manchado P-I

Se mezclaron en un tubo de 12 x 75 mm, 117,6 μ l de células suavemente con 14,7 μ l de solución colorante de reserva de P.I. Al cabo de 20 segundos, se colocó el tubo en un citómetro de flujo Coulter Elite™ y se recogieron los datos.

Procedimiento de "Discrimination of Viable and Non-Viable Cells Using Prodidium Iodide in two Color Immuno-fluorescence", Cytometry de Sasaki y cols., vol., 8, 1987, pp. 413-420.

Manchado PTA 24

Se mezclaron suavemente en un tubo de 12 x 75 mm, 23,5 μ l de células con 76 μ l de solución colorante de reserva de PTA 24. Al cabo de 20 segundos, se colocó el tubo en un citómetro de flujo Coulter Elite™ y se recogieron los datos.

Manchado Azul de tripano

Se mezclaron suavemente en un tubo de 12 x 75 mm, 5 μ l de solución de trabajo de azul de tripano y 5 μ l de células y se hizo el recuento de las células en un hemacitómetro utilizando iluminación de luz blanca normal. Se hizo un recuento de un mínimo de 500 células en 3 minutos de manchado.

Procedimiento de Selected Methods in Immunology de Mishell and Shiigi, 1980, pp. 16-17.

Protocolo de citometría de flujo: Células analizadas en el citómetro de flujo Elite™ (Coulter electronics, Inc.).

Se excitaron muestras con un láser de argón a 488 nm y 15 mW de potencia. Se seleccionaron los datos en función del tamaño y la granularidad para excluir glóbulos rojos, plaquetas, y residuos. Se analizó la fluorescencia de colorante lineal de la distribución seleccionada utilizando células sin manchar como control. Se registró el porcentaje de eventos positivos (células muertas) y la fluorescencia media de la distribución de células muertas.

ES 2 331 813 T3

TABLA 1

Colorantes de viabilidad en el citómetro Coulter Elite™

Punto en el tiempo	Muestra	% positivo (células muertas)
5 horas	P.I.	2,5
	PTA	2,2
	Azul tripano	1,4
27 horas	P.I.	6,3
	PTA	7,7
	Azul tripano	4,8
103 horas	P.I.	26,8
	PTA	19,1
	Azul tripano	10,2

Ejemplo 10

Síntesis del compuesto 85 y sus compuestos relacionados

En la figura 15 se ofrece el esquema de reacción para la síntesis general del compuesto 85 y sus precursores.

Se obtiene material de partida 81 (0-0376 hombres) de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) y se añade a un matraz de fondo redondo de 3,0 litros de capacidad y una sola boca, bajo argon y equipado con una varilla de agitación magnética, y condensador de reflujo. Se añade a este recipiente 1,0 litro de piridina deshidratada sin dejar de agitar. Se continúa agitando la suspensión resultante durante 15 minutos hasta que se disuelve todo el sólido. Se añade una cantidad catalítica de N,N-dimetilaminopiridina (1,07 g, 0,00876 moles) a esta solución al mismo tiempo que se agita. A continuación, se añade anhídrido acético (462 g, 4,9 moles) y se somete a reflujo la mezcla de reacción resultante durante 8 a 12 horas. A continuación, se deja enfriar la mezcla de reacción y se separa el disolvente al vacío. Para la purificación del producto 42 se realiza una columna sobre gel de sílice de gradiente utilizando un sistema de disolvente apropiado determinado aplicando los métodos que conocen bien las personas especializadas en este campo, como cromatografía de capa fina. Se recogen fracciones de 10,0 ml y se recombinan fracciones apropiadas y se elimina el disolvente al vacío. A continuación, se disuelve el residuo en EtOH caliente (220 ml) y se hace precipitar por enfriado a 0°C. Se decanta el licor madre y se añaden 200 ml de EtOH nuevo. Se vuelve a disolver el sólido por calentamiento y después se deja cristalizar a -4°C durante 48 horas. Se recogen los cristales del licor madre y de la segunda recrystalización y se lavan con una pequeña cantidad de EtOH frío y se secan al vacío durante varias horas. Se puede caracterizar el compuesto resultante 82 por espectrometría de masa de alta resolución tal como conocen perfectamente las personas especializadas en este campo.

Se puede sintetizar el compuesto 83 a partir de la mida 42 a través de la modificación del procedimiento de la bibliografía de Gaugain, y cols., Biochemistry, vol. 17, N° 24, 1978, pp. 5071-5078 para la cuaternización de la diamida de 3,8-diamino-6-fenil-fenantridina. Se coloca imida 82 (0,023 moles) en un matraz de fondo redondo de 2,0 litros bajo argon, equipado con una varilla magnética de agitación y condensador de reflujo. Se añade 1,3-dibromopropano (1,0 litros, 9,86 moles) al matraz y se lleva a reflujo la mezcla resultante durante aproximadamente 7 horas. Se enfría la solución durante toda la noche y se filtra el producto precipitado y se lava con Et₂O. Se recrystaliza este material en CH₃OH para producir bromouro de diacetilo 83 que se puede caracterizar por espectrometría de masa y otros métodos conocidos entre las personas especializadas en este campo.

Se añade el compuesto 83 (0,0081 moles) a un matraz de fondo redondo de 250 ml de capacidad, equipado con una varilla de agitación magnética y condensador de reflujo. Se añade después metanol (150 ml) a este matraz sin dejar de agitar bajo nitrógeno y se añade dietilen triamina (0,283 moles) que se distribuye en el comercio por Aldrich Chemical Company, al mismo tiempo que se continúa agitando. Se calienta la solución resultante a reflujo durante toda la noche bajo nitrógeno. A continuación, se deja enfriar la solución a temperatura ambiente y se vierte en H₂O destilada. A continuación, se concentra la mezcla al vacío hasta que solamente queda H₂O. Se añaden 50-75 ml más de H₂O y se enfría la mezcla de reacción a 0°C. Se filtra el sólido y se lava con agua enfriada con hielo. Se vuelve a disolver después este material en EtOH y se hace precipitar con HCl 10 N. Tras la filtración de esta suspensión, se recrystaliza el sólido resultante en etanol caliente tras el enfriado a 0°C durante aproximadamente 15 minutos. Se

ES 2 331 813 T3

recoge también una segunda cosecha del segundo filtrado tras el reposo y por precipitación con EtOH desde el primer filtrado. A continuación se combinan estos sólidos y se puede obtener el producto 84 y se puede someter a alto vacío durante toda la noche. Se puede llevar a efecto la caracterización calculando la masa molecular de la amina de base libre a partir de las fórmulas de masa isotópica exacta muy conocidas por los especialistas en este campo y comparar la masa resultante con la obtenida por determinación del peso molecular por espectrometría de masa de alta resolución tal como conocen perfectamente las personas especializadas en este campo.

Se puede llevar a cabo la síntesis y purificación del producto final 85 siguiendo el protocolo que se indica a continuación. Se disuelve la imida (0,0036 moles) 84 en 75,0 ml de metanol y se añaden 75 ml de HCl 4N. Se somete a reflujo la mezcla durante aproximadamente 2 horas y se deja enfriar. Se añade etanol a esta solución y se filtra el precipitado resultante y se lava con una cantidad mínima de etanol frío. Se reconcentra el filtrado y se añaden etanol nuevo y HCl acuoso concentrado. Se filtra también el precipitado resultante. A continuación, se concentra este filtrado casi a sequedad y se añade Et₂O y se elimina por filtración el sólido. A continuación, se disuelve lo último que queda del residuo sin filtrar en HCl concentrado y se hace precipitar con EtOH. Se filtra este material y se lava con Etanol. Se combinan los materiales sólidos de la secuencia anterior y se someten a alto nivel de vacío durante toda la noche para obtener 85. Se puede efectuar la caracterización calculando la masa molecular de la amina base libre a partir de las fórmulas de masa isotópica exactas bien conocidas entre las personas especializadas en este campo y comparando la masa resultante con la obtenida por determinación del peso molecular por espectrometría de masa de alta resolución, tal como conocen perfectamente las personas especializadas en este campo.

Ejemplo 11

Síntesis del compuesto 90 y sus compuestos relacionados

En la figura 16 se da el esquema de reacción para la síntesis general del compuesto 90 y sus precursores.

Se obtiene el material de partida 86 (0,0876 moles) de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) y se añade a un matraz de fondo redondo de 3,0 litros de capacidad de cuello simple, bajo argón y equipado con una varilla magnética de agitación y condensador de reflujo. A continuación, se añade anhídrido acético (462 g, 4,9 moles) y se somete a reflujo la mezcla de reacción resultante durante 8-12 horas. A continuación, se deja enfriar la mezcla de reacción y se separa el disolvente al vacío. Para la purificación del producto 87, se realiza una columna de gel de sílice de gradiente utilizando un sistema de disolventes apropiado determinado aplicando los métodos conocidos por las personas especializadas en este campo. Se recogen fracciones de 10,0 ml y se recombinan fracciones apropiadas y se separa el disolvente al vacío. A continuación, se disuelve el residuo en EtOH caliente (220 ml) y se hace precipitar por enfriado a 0°C. Se elimina por decantación el licor madre y se añaden 200 ml de EtOH nuevo. Se vuelve a disolver el sólido por calentamiento y se deja cristalizar a -4°C durante 48 horas. Se recogen los cristales del licor madre y de la segunda cristalización y se lavan con una pequeña cantidad de EtOH frío y se seca a alto nivel de vacío durante varias horas. Se puede caracterizar el compuesto resultante 87 por espectrometría de masa de resolución tal como conocen las personas especializadas en este campo.

Se puede sintetizar el compuesto 88 a partir de diamina 87 siguiendo una modificación de un procedimiento de la bibliografía de Gaugain, y cols., Biochemistry, vol. 17, N° 24, 1978, pp. 5071-5078 para la cuaternización de la diamina de 3,8-diamino-6-fenil-fenantridina. Se coloca diamina 87 (0,023 moles) en un matraz de fondo redondo de 2,0 litros de capacidad, bajo argón y que está equipado con una varilla magnética de agitación y condensador de reflujo. Se añade 1,3-dibromopropano (1,0 litros, 9,86 moles) al matraz y se lleva a reflujo la mezcla resultante durante aproximadamente 7 horas. Se enfría la solución durante toda la noche y se filtra el precipitante y se lava con Et₂O. Se puede recrystalizar este material en CH₃OH para producir bromuro de diacetilo 88 que se puede caracterizar por espectrometría de masa y otros métodos conocidos entre las personas especializadas en este campo.

Se añade el compuesto 88 (0,0081 moles) a un matraz de fondo redondo de 250 ml de capacidad, equipado con una varilla magnética de agitación y condensador de reflujo. A continuación, se añade metanol (150 ml) a este matraz mientras se agita bajo nitrógeno y se añade la dietil triamina (0,283 moles) que se distribuye en el comercio por Aldrich Chemical Company, mientras se continúa agitando. Se calienta a reflujo la solución resultante durante toda la noche bajo nitrógeno. A continuación, se deja enfriar esta solución a temperatura ambiente y se vierte en H₂O destilada. A continuación, se concentra esta mezcla al vacío hasta que sólo queda H₂O. Se añaden 50-75 ml más de H₂O y se enfría la mezcla de reacción a 0°C. Se filtra el sólido y se lava con agua enfriada con hielo. A continuación, se vuelve a disolver este material en EtOH y se hace precipitar con HCl 10N. Después de la filtración de esta suspensión, se recrystaliza el sólido resultante en etanol caliente con enfriado a 0°C durante 15 minutos. Se recoge también la segunda cosecha del segundo filtrado con reposo y por precipitación con EtOH desde el primer filtrado. A continuación, se combinan estos sólidos y se puede obtener el producto 89 y se somete a alto nivel de vacío durante toda la noche. Se puede efectuar la caracterización calculando la masa molecular de la amina de base libre a partir de las fórmulas de masa isotópica exacta muy conocidas entre las personas especializadas en este campo y comparar la masa resultante con la obtenida según la determinación del peso molecular de espectrometría de masa de resolución, tal como conocen las personas especializadas en este campo.

La síntesis y purificación del producto final 90 puede realizarse según el siguiente protocolo. Se disuelve la diamida (0,0036 moles) 89 en 75,0 ml de metanol y se añaden 75 ml de HCl 4N. Se somete a reflujo la mezcla durante 2 horas

y se deja enfriar. Se añade etanol a esta solución y se filtra el precipitado resultante y se lava con una cantidad mínima de etanol frío. Se reconcentra el filtrado y se añade etanol nuevo y HCl acuoso concentrado. Se filtra también este precipitado resultante. A continuación, se concentra el filtrado casi a sequedad y se añade Et₂O y se elimina por filtración el sólido. A continuación, se disuelve el último residuo sin filtrar que queda en HCl concentrado y se hace precipitar con EtOH. Se filtra este material y se lava con Etanol. Se combinan todos los materiales sólidos desde la secuencia anterior y se someten a alto nivel de vacío durante toda la noche para obtener el compuesto 90. Se puede efectuar la caracterización calculando la masa molecular de la amina de base libre a partir de las fórmulas de masa isotópica exacta muy conocidas entre las personas especializadas en este campo y comparar la masa resultante con la obtenida según la determinación del peso molecular de espectrometría de masa de resolución tal como se conoce entre las personas especializadas en este campo.

Ejemplo 12

15 Ensayo de hibridación empleando el compuesto 24

En uno de los experimentos se utilizó PTA 24 para determinar cuantitativamente la hibridación cuando se valoró el oligonucleótido diana con su socio complementario. Llevando también tres experimentos simultáneos pero independientes, se realizó una comparación del manchado con bromuro de etidio, manchado con yoduro de propidio y manchado como homodímero de etidio frente a PTA 24 del siguiente modo. En la figura 17 se pueden encontrar los resultados.

Se obtuvieron hebras complementarias de ADN ácido oligodesoxitimidílico (d(pT)) y ácido oligodesoxiadénílico (d(pA)), de Sigma Chemical Co., en St. Louis, MO. Se obtuvo una solución de reserva de d(pA) a 5,0 unidades/0,5 nd de TRIS 0,004 M, EDTA 0,001 M, tampón pH 8,2. Para poly A, $\epsilon = 8,4 \text{ AU/mM cm}$ o $8400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Por lo tanto, con 9 pares de base para d(pA), ϵ es $75.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A continuación, se diluyó esta solución de reserva a 100 X para obtener una solución de reserva a $6,61 \times 10^{-1} \text{ M}$ o $0,66 \mu\text{M}$. Se obtuvo la solución de reserva de d(pT) 9a 25 unidades/5,0 ml y se utilizó para valoración tras la dilución 10x con el mismo tampón. Dado que ϵ para poly T es $8,15 \text{ AU/mM cm}$ o $8.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ por par de base, o $73.350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ por oligo, la concentración de la solución de reserva de oligo fue $6,8 \mu\text{M}$ en moléculas de ADN. Se realizó la valoración utilizando espectrofotómetro de fluorescencia F-4010 Hitachi utilizando cubetas de poliestireno desechables de 4,0 ml para obtener un espectro totalmente corregido y una longitud de onda de excitación de 488-550 nm (utilizando 488 nm para este experimento) y una longitud de onda de emisión de 600-650 nm (utilizando 625 nm para este experimento). Se añadieron equivalentes de d(pT) en los siguientes incrementos: 0,020, 0,080, 0,150, 0,300, 0,500, 0,700, 1,000, 2,000, 5,000 equivalentes. Se preparó cada una de las muestras de la curva de valoración individualmente dividiendo la solución de reserva de d(TA) inicial en incrementos de $10 \times 1,0 \text{ ml}$. A continuación, se llevó a cabo la adición de complemento por micropipeteado de una cantidad apropiada (2, 5, 8, 15, 30, 50, 70, 100, 200 y $500 \mu\text{l}$, respectivamente) de solución de reserva de d(pT)9 para cada una de la serie de las 10 partes alícuotas. Se incubó cada una de las partes alícuotas, que contenía progresivamente relaciones molares mayores de las dos hebras complementarias, a temperatura ambiente durante 1 hora y 45 minutos, se añadió el colorante correspondiente como partes alícuotas de $100,0 \mu\text{l}$ de una solución $15 \mu\text{M}$ del colorante correspondiente en TRIS 0,004 M, EDTA 0,001M, tampón pH 8,2. Esto corresponde a la relación colorante/p.b ADN de $\frac{1}{4}$ a una saturación con oligo complementario. Las concentraciones globales del colorante y oligo varían en el gráfico de saturación debido al uso de adiciones de incrementos diversos desde la misma solución de reserva. Al cabo de 45 minutos más de período de incubación tras la adición del colorante apropiado correspondiente, se realizó la lectura la intensidad de fluorescencia relativa a 625 nm y se registró para generar una curva patrón que es directamente proporcional a la cantidad de hibridación de ADNds, o secuencia diana, en las mismas condiciones. A continuación, se sustrae el fondo, o la fluorescencia residual inicial como una constante para todas las curvas para comparar las diversas curvas de valoración en los mismos gráficos.

Para las personas especializadas en este campo será evidente que la alta afinidad de unión del compuesto intercalador 24 es especialmente útil en comparación con los intercaladores convencionales como bromuro de etidio (figura 17). En la figura 17, se muestra la sensibilidad o respuesta a la concentración de ADN ds en presencia del compuesto intercalador 24 en comparación con bromuro de etidio, yoduro de propidio y homodímero de etidio. Cuando las concentraciones de oligonucleótido son inferiores a 10^{-6} M , las ventajas de dichos intercaladores de alta afinidad son especialmente evidentes.

En la comparación de PTA 24 con intercaladores homobifuncionales como homodímero de etidio (figura 17), se observa una vez más una clara ventaja en sensibilidad. En este caso, se puede relacionar la mayor sensibilidad con un menor auto-apagado en PTA 24 así como su alta afinidad para ADN.

En la figura 8 y en la figura 9, la concentración de ADN ds fue más alta y el diferencial entre el bromuro de etidio y PTA 24 (figura 9) y homodímero de etidio y PTA 24 (figura 8) no fue significativo debido a la mayor concentración de ADN utilizada.

Resumiendo, la presente invención ofrece claras ventajas al determinar la detección de la hibridación de ADN ds a concentraciones mucho más bajas que las de los métodos de manchado convencionales disponibles en la actualidad en la técnica.

Ejemplo 13

Ensayo de hibridación utilizando el compuesto intercalador 24

Se puede utilizar intercalador de ADN 24 para determinar cuantitativamente la hibridación cuando se valora un oligonucleótido con su socio complementario. Se pueden obtener hebras complementarias de ADN ácido oligodesoxitimidílico (d(pT)) y ácido oligodesoxiadenílico (d(pA)), de Sigma Chemical Co., en St. Louis, MO. Se obtuvo una solución de reserva de d(pA)9 a 5,0 unidades/ml de TRIS 0,05 M, NaCl 0,2N, EDTA 1 mM, tampón pH 8,4 u otro tampón adecuado. Para poly A, $\epsilon = 8,4 \text{ AU/mM cm}$ o $8.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Por lo tanto, con 9 pares de base para d(pA)9, ϵ es $75.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A continuación, se diluyó esta solución de reserva para obtener una solución de reserva en 0,066-66 μM . Se obtuvo la solución de reserva de d(pT) a 25 unidades/5,0 ml y se utilizó para valoración sin posterior dilución en el mismo tampón. Dado que ϵ para poly T es $8,15 \text{ AU/mM cm}$ o $8.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ por par de base, o $73.350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ por oligo, la concentración de la solución de reserva de oligo es 0,0068-660 μM en moléculas de ADN. Se puede realizar la valoración utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 488 -550 nm (óptima en torno a 534) y una longitud de onda de emisión de 600-650 nm (óptima en torno a 625). Se añadieron equivalentes de d(pT) en los siguientes incrementos: 0,02, 0,05, 0,080, 0,150, 0,300, 0,500, 0,700, 1,00, 2,00, 5,00 equivalentes. Se preparó cada una de las muestras de la curva de valoración individualmente dividiendo la solución de reserva d(pA)9 inicial en partes alícuotas de 10 x 1,0 ml. A continuación, se llevó a cabo la adición de complemento por micropipeteado de una cantidad apropiada (2, 5, 8, 15, 30, 50, 70, 100, 200 y 500 μl , respectivamente) de solución de reserva de d(pT)9 para cada una de la serie de las 10 partes alícuotas cuando la solución de reserva d(pT)9 es 10x la concentración de la solución de reserva d(pA)9. Se incubó cada una de las partes alícuotas, obteniendo progresivamente relaciones molares mayores de las dos hebras complementarias a temperatura ambiente durante 0,25 - 2,5 horas, se añadió el colorante como partes alícuotas de 1-500 μl de una solución 1-1000 μM del colorante en TRIS 0,05 M, NaCl 0,2N, EDTA 1 mM, tampón pH 8,4 u otro tampón adecuado. Esto corresponde a la relación colorante/p.b ADN de 1/1-1/1000 en saturación con oligo complementario. Las concentraciones globales del colorante y oligo varían en el gráfico de saturación debido al uso de adiciones de incrementos diversos desde la misma solución de reserva. Al cabo de 15 minutos más de período de incubación, se realizó la lectura de la intensidad de fluorescencia relativa entre 580-680 nm y se registró para generar una curva patrón que es directamente proporcional a la cantidad de hibridación de ADNds, o secuencia diana, en las mismas condiciones.

Ejemplo 14

Determinación de la hibridación de pares de unión complementarios distintos a d(pT)9 y d(dA)9 utilizando el compuesto intercalador 24

Aplicando el mismo procedimiento que se ha descrito en el ejemplo 13, se puede utilizar el compuesto intercalador 24 para determinar la cantidad de hibridación de cualquier otra hebra de ADN complementaria sustituyendo d(pT)9 por el ADN complementario apropiado y sustituyendo d(pA)9 por el ADN diana apropiado a concentraciones apropiadas que sean determinadas por la personas especializada en este campo y dependiendo del grado de regiones complementarias que se espera según la determinación de la persona especializada en este campo. En cada uno de los casos, se puede utilizar la longitud de onda de excitación de 450-550 nm (óptima a 534 nm) y después se lee la intensidad de fluorescencia relativa a entre 580-680 nm y se registra para generar una curva patrón que es directamente proporcional a la cantidad de hibridación de ADNds, o secuencia diana, en estas condiciones.

Ejemplo 15

Protocolo para la síntesis de reactivo de captura de micropartículas de carboximetil estireno activadas con intercalador utilizando el compuesto intercalador 85 o 90

Se puede llevar a cabo la síntesis del reactivo de captura de micropartículas (MP) en fase sólida derivatizado de intercalador a través del siguiente procedimiento.

Se colocan 45 partes alícuotas de partículas de $0,275 \pm \mu\text{m}$ (Seradyne, Indianapolis, IN) en un vial de 4 ml y se intercambia el agente tensioactivo utilizando resina de lecho mixta de intercambio iónico Bio-Rex 501-D (Bio-Rad, Richmond, CA). Tras una agitación suave durante 2 horas, se separa por filtración la resina de la mezcla utilizando un embudo de vidrio sinterizado toscó equipado con una cámara de recogida de la presión reducida. Se diluye la muestra a una concentración de mp a 10% en peso de sólidos. Se calcula la cantidad total de equivalentes de ácido carboxílico reactivo a partir de las especificaciones de valoración del vendedor. Se obtiene una solución de reserva de sulfo N-hidroxisuccinimida (Pierce, Rockford, IL) a 11 mg/ml (20 mM) en H_2O y se obtiene una solución de reserva de EDAC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 10 mg/ml (5 mM) en H_2O . Se añaden cinco equivalentes de EDAC (290 μl de solución de reserva) a la mezcla de reacción de micropartículas de carboxi, seguido de 5,0 equivalentes de sulfo N-hidroxisuccinimida (330 μl de reserva). Se deja incubar esta mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas y después se añade un equivalente 2,0 molar de compuesto intercalador 85 o 90 (4 mg) a una concentración de 8 mg/400 μl o 2,0 mg/100 μl en tampón Pi fosfato 0,1 N NaCl 0,1 molar, pH 8,0. Se puede sustituir sulfo N-hidroxisuccinimida (Pierce) por N-hidroxisuccinimida si se disuelve primero en una solución de reserva de DMF (dimetil formamida) y se reparte en partes alícuotas, tal como se ha descrito anteriormente. Después de dejar 24 horas para completar la reacción, se

ES 2 331 813 T3

separa el colorante libre por centrifugado, se elimina el licor madre y se vuelve a realizar la resuspensión en varios intentos hasta que la solución queda transparente y no se extrae ya más colorante de las muestras. A continuación, se diluye el reactivo de captura purificado para una solución de reserva de 2-4% de sólidos en H₂O.

5 Ejemplo 16

Captura de ADN en fase sólida utilizando fase sólida derivada de compuesto 85 o 90

10 Se puede realizar la captura de ADN en la fase sólida utilizando los métodos de derivatización que se describen en el ejemplo 5 a excepción de que se sustituye la fase sólida apropiada sintetizada desde el intercalador correspondiente 85 o 90 tal como se ha descrito en el ejemplo 15.

15 Se pueden utilizar también otras fases sólidas apropiadas como micropartículas de poliestireno carboxiladas o micropartículas magnéticas carboxiladas en lugar de Sefarosa CM.

Ejemplo 17

20 *Protocolo para la captura de ADN mediante fase sólida modificada con intercalador con el compuesto 85 o 90*

Se puede liberar ADN de la fase sólida tal como se ha descrito en el ejemplo 6 con la excepción de que se utiliza la fase sólida correspondiente derivada del compuesto intercalador 85 o 90 en lugar del intercalador derivatizado PTA 24.

25

Ejemplo 18

30 *Conjugados de anticuerpos derivatizados intercalador fosfatasa alcalina derivatizada intercalador utilizando ácidos nucleicos de doble hebra como plantillas de conjugación*

Se pueden sintetizar hebras complementarias de oligonucleótidos, sentido y antisentido 14 a 20 meros, en un sintetizador de ADN completamente automático y purificado tal como se describe en Bioconjugate Chemistry, 4 pp. 94-102 (1993). La síntesis del conjugado entre la enzima, fosfatasa alcalina intestinal de becerro e IgG se puede llevar a cabo del siguiente modo.

35

a) Derivatización del intercalador PTA24 con brazo de ligador heterobifuncional de 30 átomos, 4-[(N-maleimido-metil)tricaproamido]ciclohexano-1-carboxilato (SMTCC).

40

Se disuelve PTA 24, 0,100 g ($2,3 \times 10^{-4}$ moles) en 5 ml de DMF acuoso al 50% (dimetilformamida). Se disuelve el ligador heterobifuncional de 30 átomos, 4-[(N-maleimidometil)tricaproamido]ciclohexano-1-carboxilato (SMTCC), 0,157 g, ($2,3 \times 10^{-4}$ moles) sintetizado tal como se describe en Bieniarz y cols., patentes EE.UU. N° 4.994.385, 5.002.883, 5.053.520, y 5.063.109 en 3 ml de DMF y se añade una porción a la solución y se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. Se purifica la maleimida resultante derivatizada PTA 24 contenida sobre columna sobre gel de sílice utilizando acetona metanólica al 10% como eluyente.

45

b) Derivatización de la fosfatasa alcalina intestinal de becerro con iminotiolano.

50

Se somete a tiolización fosfatasa alcalina intestinal de becerro, 6 mg (4×10^{-9} moles) en 1 ml de tampón PBS por tratamiento con un exceso molar 450 veces mayor de iminotiolano (164 ml de una solución de 15 mg/ml en tampón PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separa el exceso de reactivo por filtración de gel con una columna G-25 Sefadex (1 x 45 cm) equilibrada con tampón PBS.

55

Se reparten las fracciones que contienen la enzima derivatizada y se calcula la concentración de la enzima en la distribución por absorbancia a 280 nm.

60 c) Conjugación PTA 24 derivatizada de SMTCC con la fosfatasa alcalina intestinal de becerro tiolada de b).

Se combinan la fosfatasa alcalina intestinal de becerro tiolada de la parte b) y PTA 24 derivatizada de maleimida de la parte a) en una relación molar de 1:1 y se incuban durante 18 horas a 5°C. Se rematan los grupos tiol sin reaccionar por adición de N-etilmaleimida 5 mM a una concentración final 0,3 mM seguido de 1 hora de incubación a temperatura ambiente.

65

ES 2 331 813 T3

d) Derivatización de IgG con tiolatos utilizando funcionalización específica de sitio de la región Fc de IgG. La introducción específica de sitio de tiolatos en la región Fc de IgG se lleva a cabo tal como describe Bieniarz y cols., patente EE.UU. N° 5.191.066. De este modo, se introducen entre 4 y 10 tiolatos en la región Fc del IgG.

e) Derivatización de IgG tiolado con Fc de la parte d) con PTA 24 derivatizada de maleimida de la parte a).

Se combinan la IgG tiolada en Fc de la parte d) con PTA 24 derivatizada de maleimida de la parte a) a una relación molar de 1:5 de IgG tiolado a PTA 24 derivatizado de SMTCC. Se incuba la solución en tampón fosfato pH 7,0 durante 18 horas a 5°C y se purifica el conjugado en la columna de filtración de gel Sephadex G-25. Se distribuyen las fracciones que contienen proteínas y se concentran utilizando concentrador Amicon. Se establece el contenido en proteínas de la solución final utilizando un ensayo de unión de colorante Coomassie, de Pierce Company.

f) Conjugación de la IgG derivatizada de PTA 24 de la parte e) con la fosfatasa alcalina intestinal de becerro derivatizada de PTA 24 de la parte c) utilizando un oligonucleótido de 20 meros de doble hebra compuesto de las hebras complementarias de los oligos. Se hibridan las hebras complementarias de oligonucleótidos y se examinan tal como se describe en Bioconjugate Chemistry, 4. pp. 94-102 (1993). Se incuban IgG derivatizado de PTA 24 de la parte e), fosfatasa alcalina de becerro derivatizada con PTA 24 y oligonucleótido de doble hebra de 20 meros utilizado como plantilla de conjugación durante toda la noche a un pH 7,0 durante 18 horas en relaciones molares de 1:1:1 a temperatura ambiente. Se filtra el conjugado a través de una columna de filtración de gel G-25. Se ensayan las fracciones para determinar la actividad de fosfatasa alcalina utilizando fluorogénico sustrato de fosfato de 4-metillumbeliferilo, y para la actividad de anticuerpo, utilizando la IgG antidiotípica etiquetada con fluoresceína.

Se examinaron también los conjugados a través de columnas de HPLC de filtración de gel.

Ejemplo 19

Conjugación de liposoma derivatizado de intercalador con ADN de doble hebra

Se lleva a cabo la preparación de los liposomas tal como describe Fiechtner y cols., patente EE.UU. N° 4.912.208. Estos liposomas se presentan en sus aminas primarias superficiales ya que se preparan a partir de lípidos de difosfatidiletanolamina. Se lleva a cabo la preparación de los liposomas en presencia de colorantes fluorescentes de membrana impermeable descritos en la patente EE.UU. N° 4.912.208. De este modo, las moléculas de los colorantes fluorescentes están sustancialmente a concentraciones muy altas, de autoapagado dentro de los liposomas y, en consecuencia, no son fluorescentes. Se derivatizan las aminas superficiales de los liposomas con tiolatos aplicando esencialmente el mismo método que el usado para introducir tiolatos en la fosfatasa alcalina descrito en el ejemplo 18. Se derivatizan PTA 24 y otros intercaladores descritos en los ejemplos anteriores con maleimidas utilizando reactivo SMTCC, tal como se ha descrito en el ejemplo 18. Se incuban los liposomas derivatizados con tiolato y PTA 24 derivatizada con maleimida u otros intercaladores juntos en un recipiente en condiciones esencialmente idénticas a las que se han descrito en el ejemplo 18. Se incuban los liposomas que contienen colorante fluorescente derivatizados con múltiples intercaladores a un pH comprendido entre 5 y 9, preferiblemente 7,0 con la muestra que contiene pequeñas concentraciones de ADN de doble hebra revestido o inmovilizado en una fase sólida. Se sigue la incubación por lavado y la adición de detergente. La lisis concomitante de la membrana de liposoma tiene como resultado el derramado de colorante fluorogénico, el apagado de la fluorescencia y la aparición de señal.

Alternativamente, se puede inmovilizar el ADN de hebra única multimérico de sonda en una fase sólida; se incuban la muestra del paciente que contiene presuntamente el ADN de hebra simple complementaria en presencia de la sonda; se pone en contacto el liposoma-intercalador con la muestra hibridada y se incuban el contenido del recipiente y se lava varias veces para eliminar el exceso de los liposomas derivatizados con PTA 24. Si la sonda encuentra una secuencia complementaria en la muestra del paciente, la adición del detergente tiene como resultado la lisis de los liposomas y la señal. Si, en cambio, la sonda y las hebras de ADN de la muestra del paciente no son complementarias, no hay presencia de ADN de doble hebra y sustancialmente todo el liposoma derivatizado de PTA 24 se elimina por lavado de la fase sólida, con el resultado de ausencia de señal.

Ejemplo 20

Detección de ADN utilizando conjugado de intercalador fluorescente derivado del compuesto intercalador 24, 85, o 90

La síntesis del intercalador funcionalizado con maleimida se puede llevar a efecto a través del procedimiento que ya se ha descrito en el ejemplo 18 a excepción de que se utiliza el compuesto intercalador 85 o 90 en lugar de PTA 24. Se une covalentemente una entidad que genera una señal apropiada como ficoeritrina o alofococianina con este intercalador derivatizado con maleimida a través de un tiolato en la proteína tiolada preparada tal como se ha descrito en el ejemplo 18. Después de dejar un tiempo para la unión de la porción del intercalador del conjugado con la molécula de ADNds inmovilizada y eliminar por lavado el conjugado sin unir, se detecta el ADN de doble hebra sobre

la fase sólida u otra entidad inmovilizada utilizando la fluorescencia de la ficoeritrina que se localiza por la unión de la porción de intercalador con las moléculas de ADN de doble hebra. Se hace la lectura de la emisión de fluorescencia a aproximadamente 580 nm utilizando métodos conocidos entre las personas especializadas en la técnica al mismo tiempo que se excita la proteína fluorescente a una longitud de onda que es apropiada para una excitación eficiente tal como puede determinarlo una persona especializada en este campo.

Ejemplo 21

10 *Detección de ADN utilizando un conjugado de intercalador de enzima derivado del compuesto intercalador 24, 85 o 90*

Se puede llevar a cabo la síntesis del intercalador funcionalizado con maleimida a través del procedimiento que ya se ha descrito en el ejemplo 18, con la excepción de que se utiliza el compuesto intercalador 85 o 90 en lugar de PTA 24. Se une covalentemente una entidad que genera señal, como fofatasa alcalina, β -galactosidasa, esterasa o β -lactamasa con su intercalador derivatizado de maleimida a través del tiolato de la proteína tiolada que se prepara tal como se ha descrito en el ejemplo 18. Después de dejar un tiempo para la unión de la porción de intercalador del conjugado con la molécula de ADNds inmovilizada y eliminar por lavado el conjugado no unido, se detecta el ADN de doble hebra sobre la fase sólida u otra entidad inmovilizada como por ejemplo coloide o micropartícula por fluorescencia o quimioluminiscencia ofrecida por el cambio de un sustrato no quimioluminiscente o no fluorescente de la enzima apropiada a una entidad quimioluminiscente o fluorescente respectivamente tal como lo determina una persona especializada en este campo. A continuación, se realiza la emisión de la fluorescencia o quimioluminiscencia a las longitudes de onda apropiadas utilizando métodos patrón de excitación de fluorescencia o detección de quimioluminiscencia, respectivamente que son conocidos entre las personas especializadas en este campo.

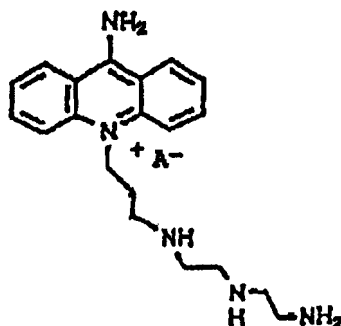
Ejemplo 22

30 *Detección de ADN utilizando un conjugado de intercalador-quimioluminoforo derivado de compuesto intercalador 24, 85 o 90*

Se puede llevar a efecto la síntesis del intercalador funcionalizado con maleimida siguiendo el procedimiento que ya se ha descrito en el ejemplo 18 a excepción de que se utiliza el compuesto intercalador 85 o 90 en lugar de PTA 24. Se une covalentemente una entidad de generación de señal quimioluminiscente que se puede activar apropiada como acridinio sulfonamida con este intercalador mediante un tiolato de la entidad quimioluminiscente que se prepara para ser reactiva con la maleimida, tal como pueden diseñarlo las personas especializadas en este campo. Después de la unión del ADN-ds con el conjugado intercalador-quimioluminoforo, se elimina por lavado el exceso del conjugado sin unir y se detecta después el ADN de doble hebra sobre la fase sólida o la entidad inmovilizada por quimioluminiscencia directa estimulada por la adición de un reactivo de activación apropiado, como peróxido de hidrógeno, que lleva a una entidad de quimioluminiscencia y después se hace la lectura de la quimioluminiscencia a las longitudes de onda apropiadas utilizando métodos de detección de quimioluminiscencia normales tal como conocen las personas especializadas en este campo.

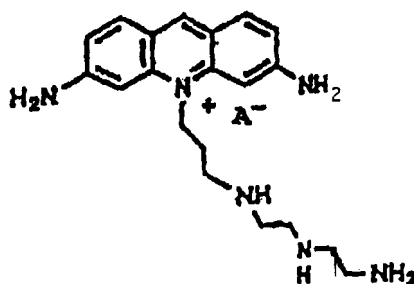
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula:



en la que A^- es un contraión monovalente aceptable.

2. Un compuesto representado por la fórmula:



en la que A^- es un contraión monovalente aceptable.

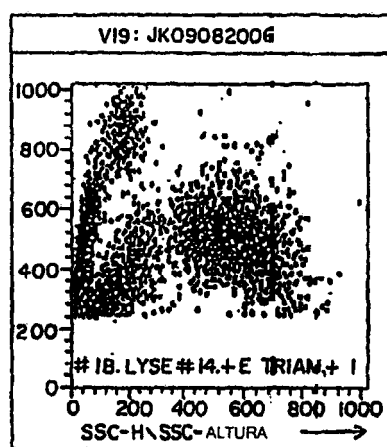


FIG. 1

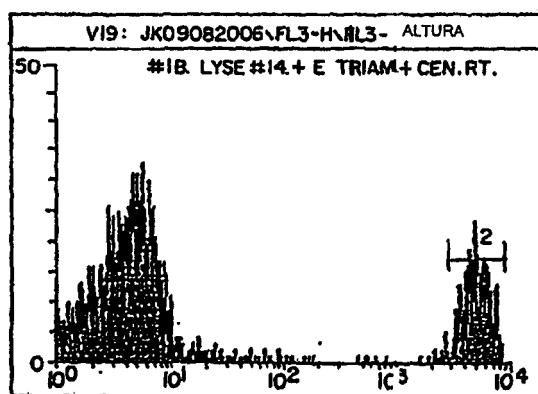


FIG. 2

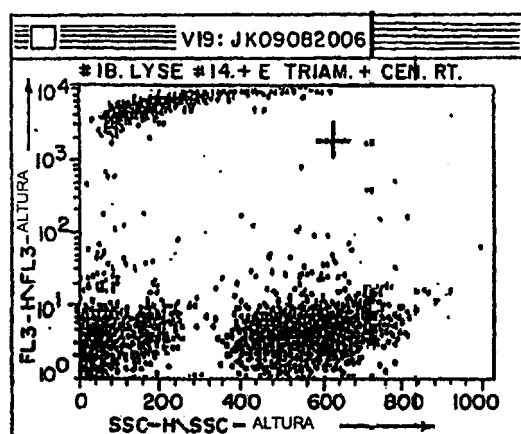


FIG.3

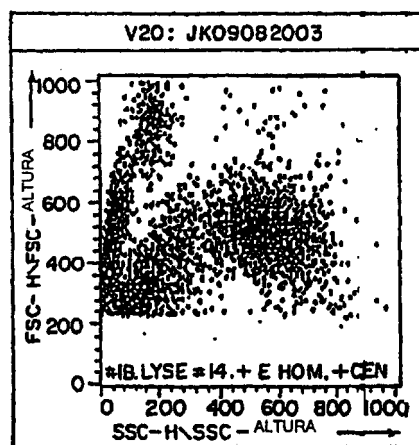


FIG.4

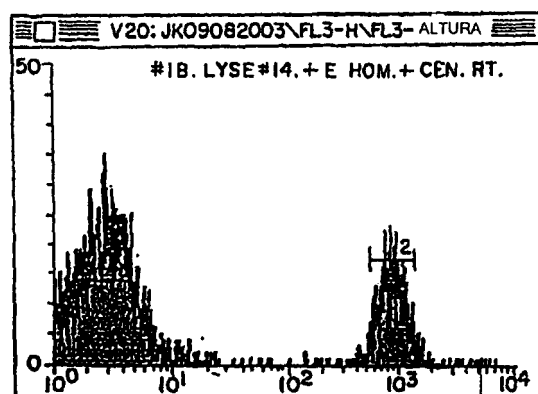


FIG.5

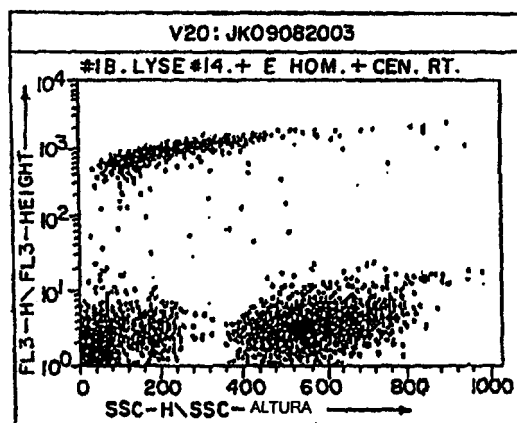


FIG.6

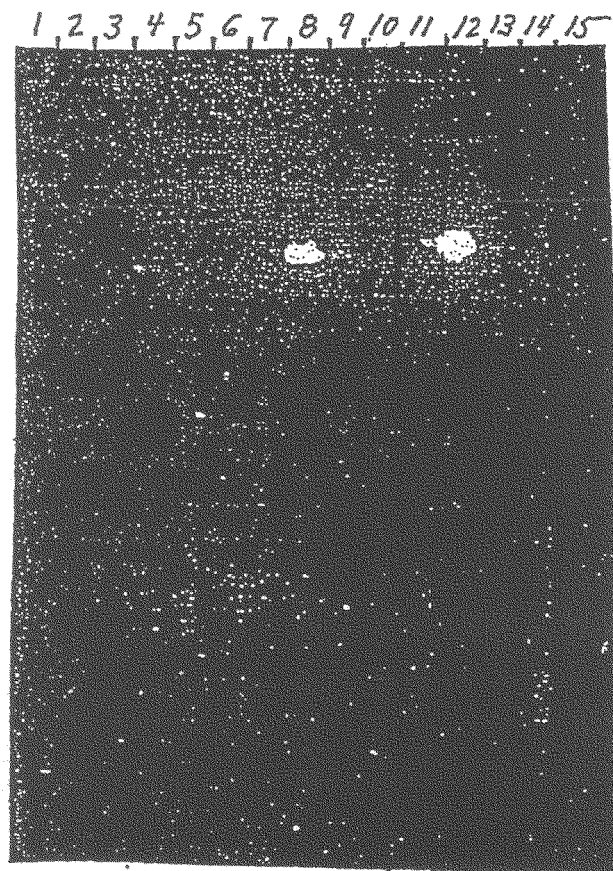


Fig. 7

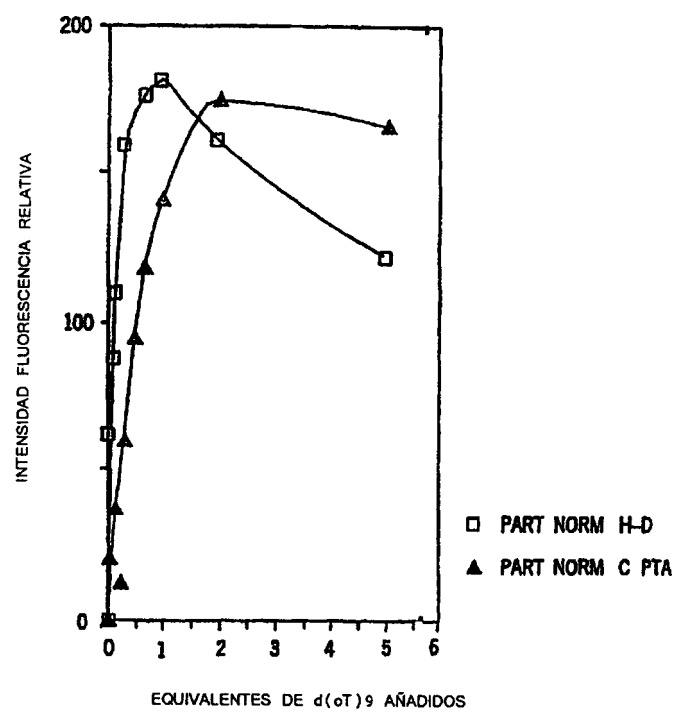


FIG. 8

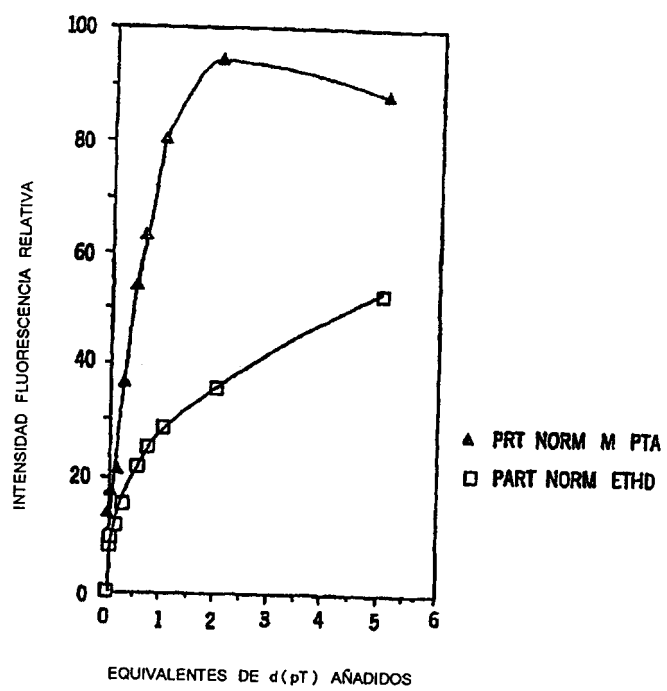


FIG. 9

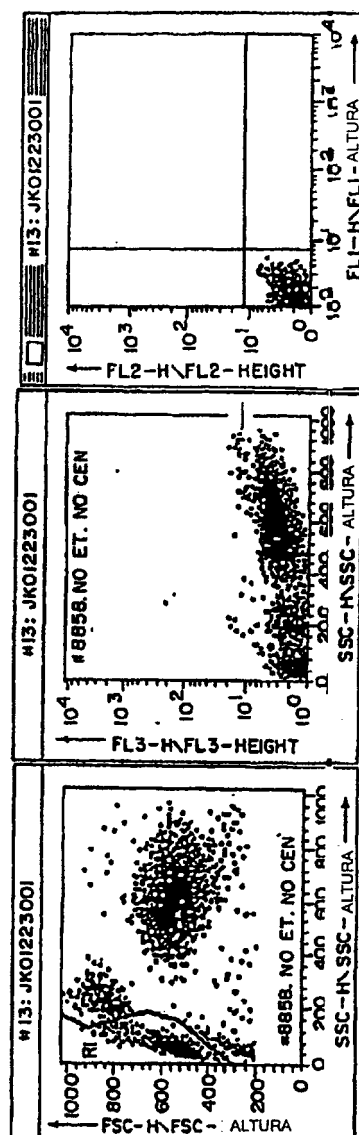


FIG.10A

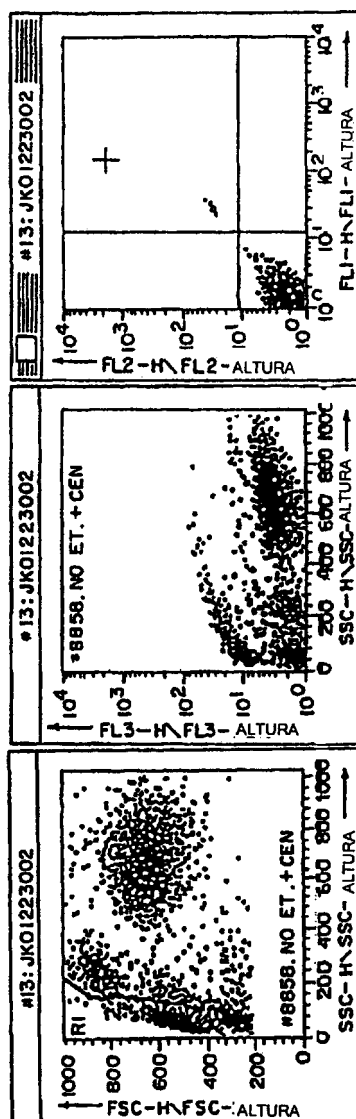


FIG.10B

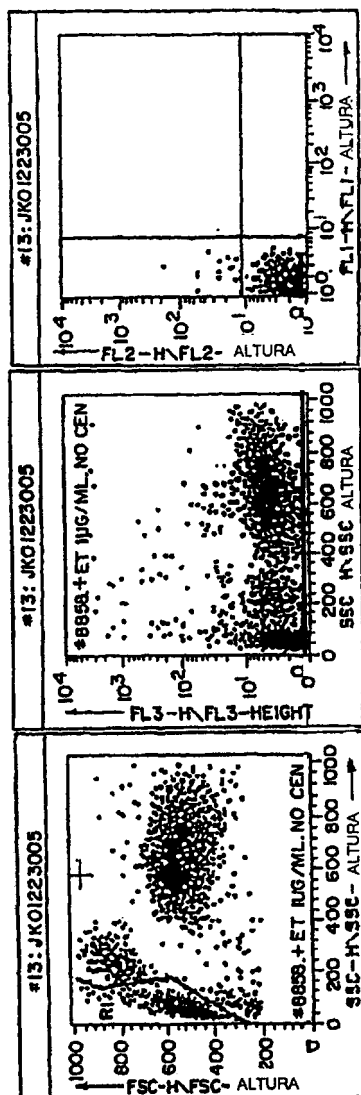


FIG.10C

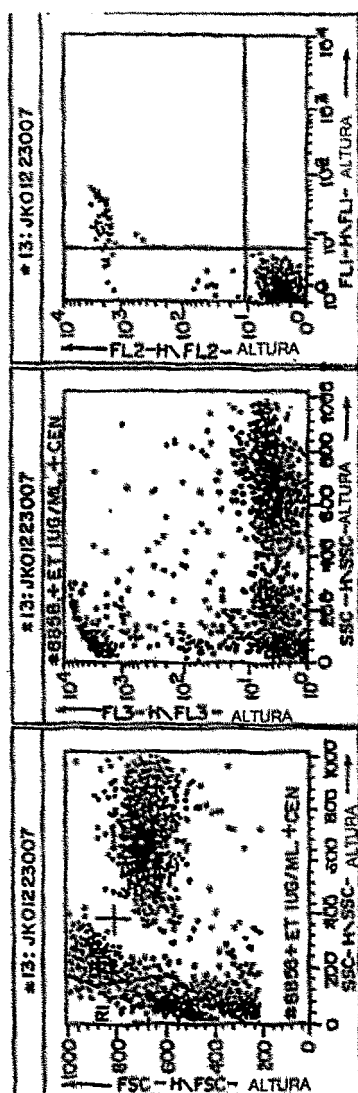


FIG.10D

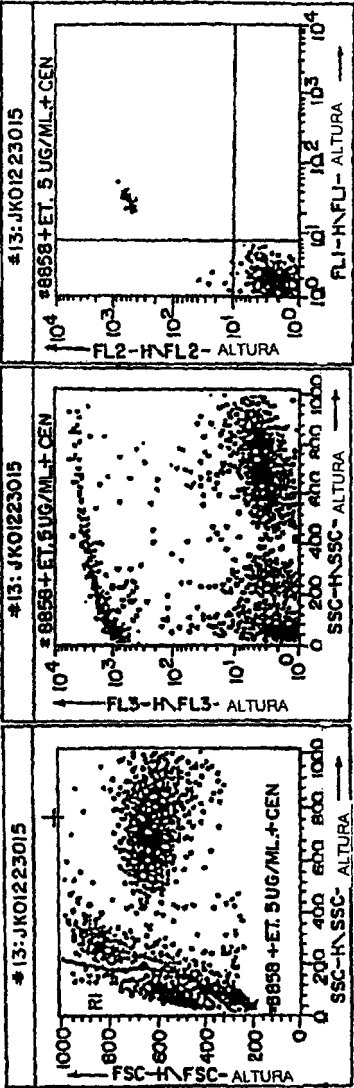


FIG.10E

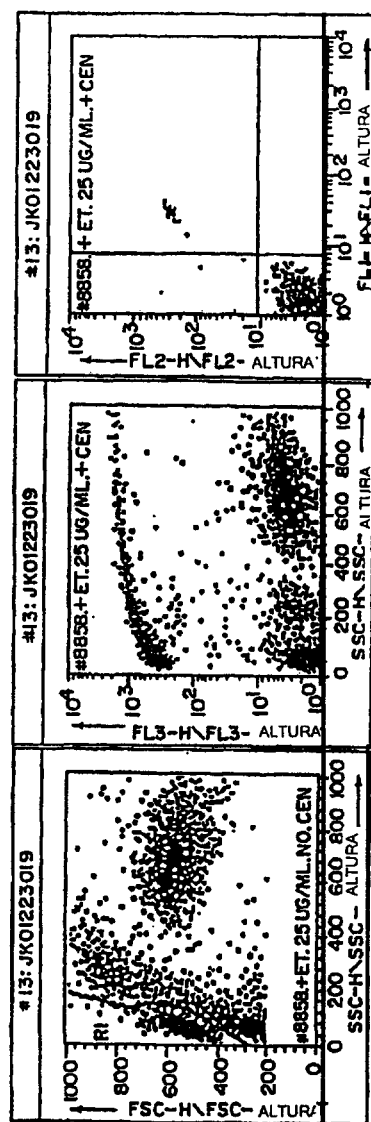


FIG.10F

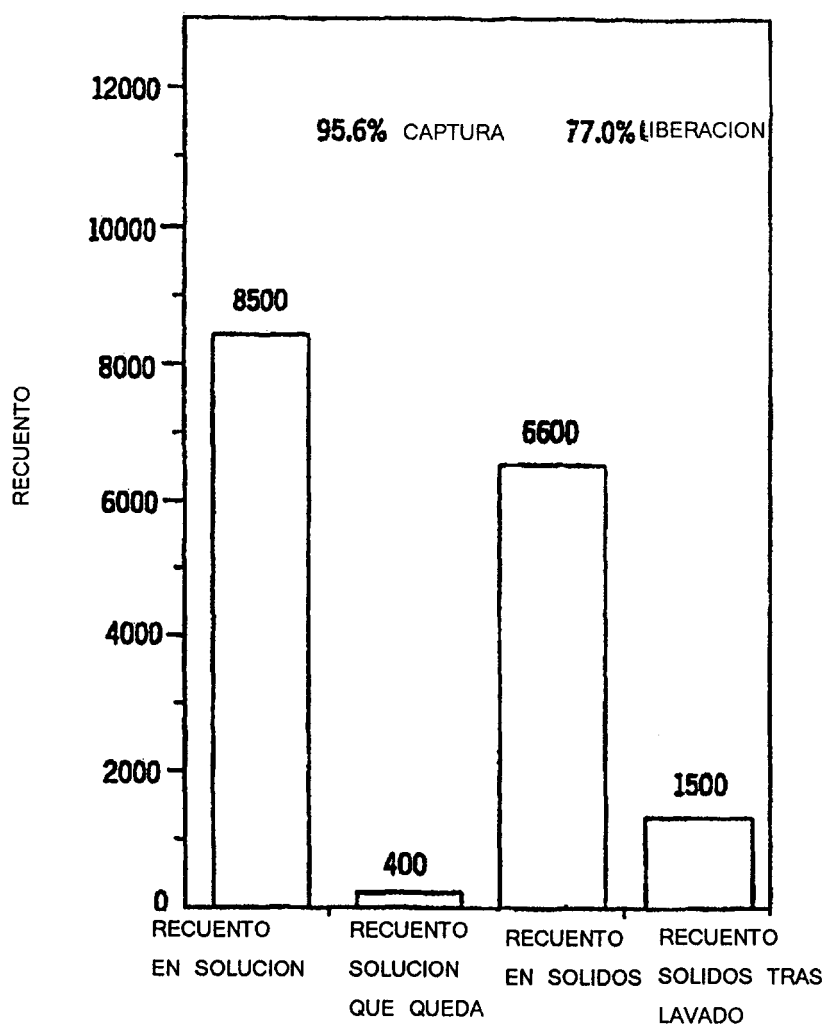


FIG. 11

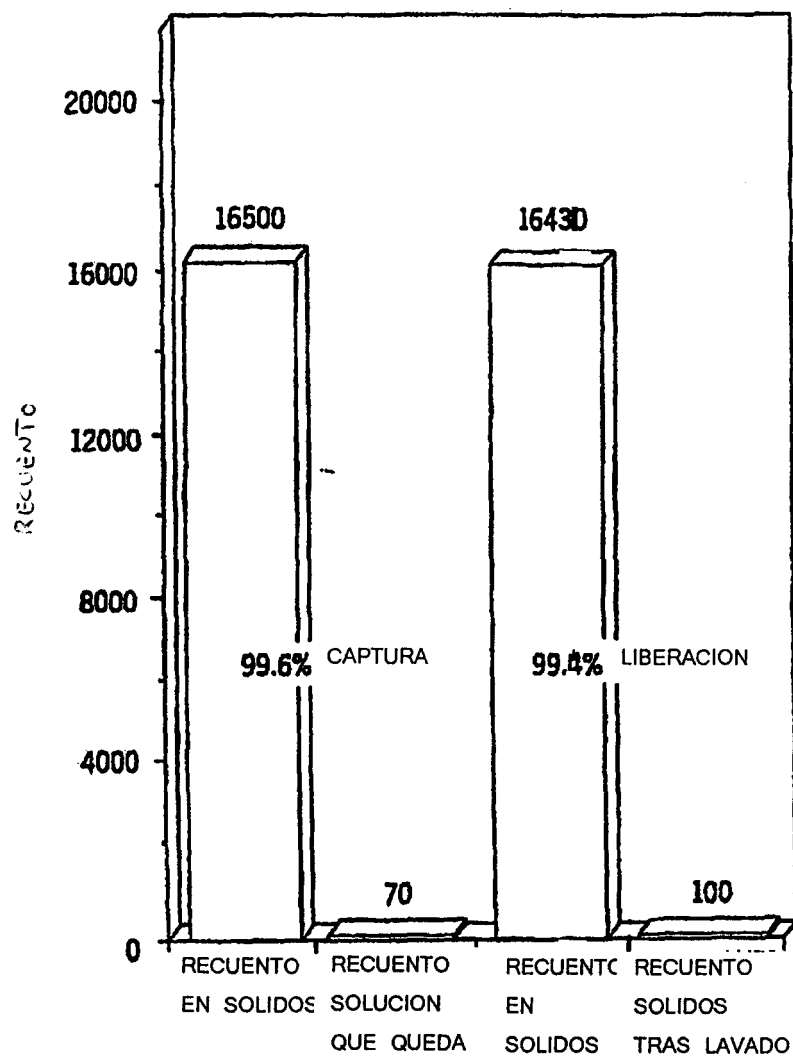


FIG. 12

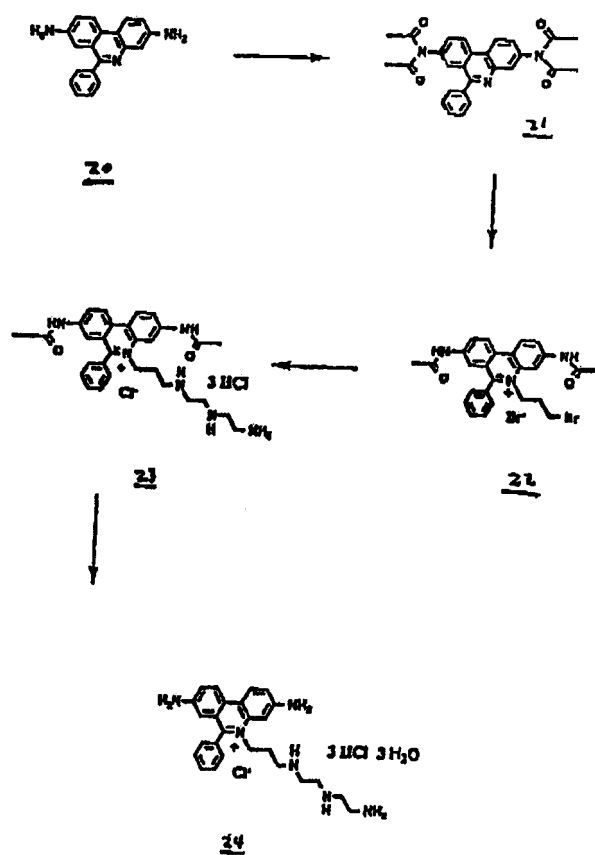


FIGURA 13

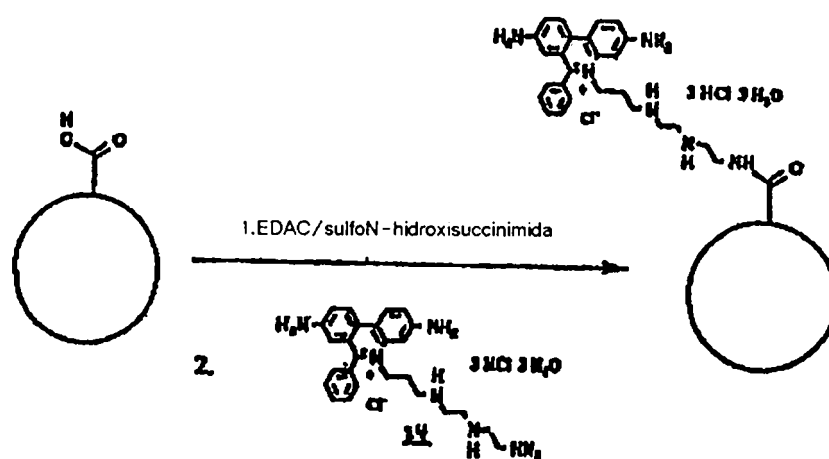


FIGURA 14

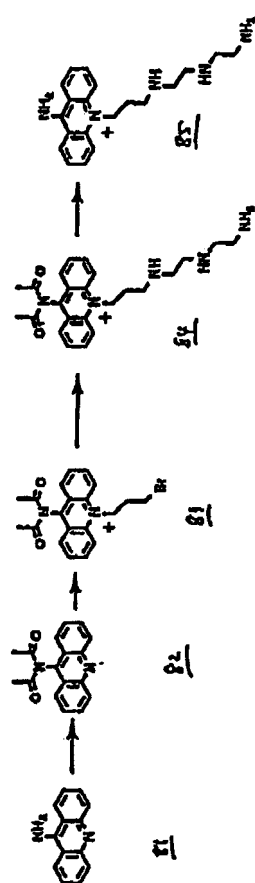


FIGURA15

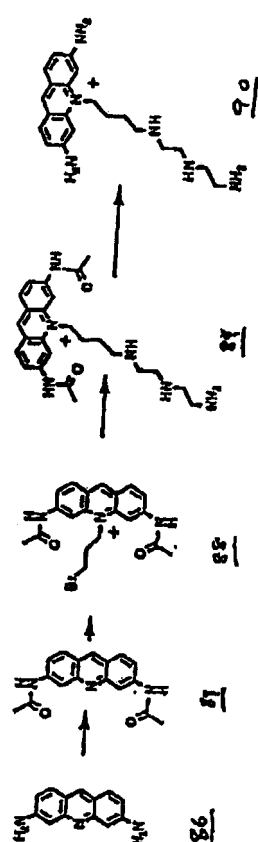


FIGURA 16

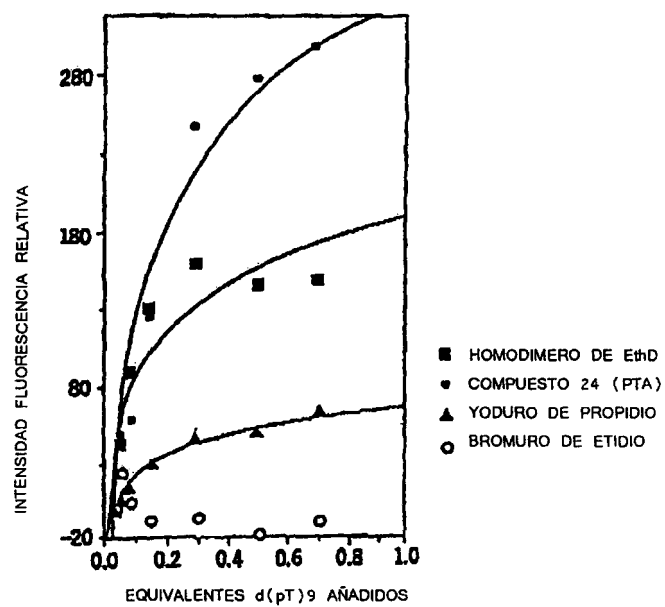


FIG. 17