



Inventor:	COFD

P A T E N T E  
 D E  
 I N V E N C I O N

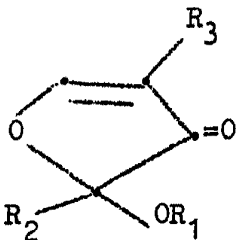
por "UN METODO PARA MARCAR DE FORMA FLUORESCENTE UN MATERIAL CONTENIENDO UN GRUPO AMINICO PRIMARIO", a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, S.A., residente en BASILEA (Suiza).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un método para marcar de forma fluorescente un material que contenga un grupo amínico primario, cuyo método comprende tratar dicho material, en un medio acuoso, con un compuesto de la fórmula

5. la



(I)

10.



en la que

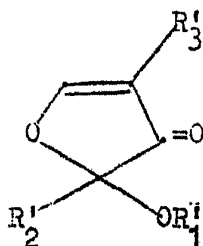
- $R_1$  es alquilo inferior, fenil-alquilo inferior;
- $R_2$  es fenilo o fenilo substituído y
- $R_3$  es fenilo substituido o insubstituído, naf-  
tilo o indolilo.

5.

Además, el presente invento se refiere a grupos amínicos primarios que contienen materiales marcados con un compuesto de la fórmula I y al empleo de dichos materiales en métodos de diagnóstico.

10.

El presente invento se refiere, asimismo, a nuevos compuestos de la fórmula



(II)

15.

en la que

- $R_1'$  es alquilo inferior o fenil-alquilo inferior,
- $R_2'$  es fenilo o fenilo substituído y
- $R_3'$  es fenilo substituido o insubstituido, naf-  
tilo o indol, con la salvedad de que cuando  $R_2'$  y  $R_3'$   
son ambos fenilo, entonces  $R_1'$  es alquilo infe-  
rior con más de un átomo de carbono o fenil-al-  
quilo inferior con más de 7 átomos de carbono,

20.

y a un procedimiento para su preparación.

25.

El ejemplo más importante de la utilidad diagnós-  
tica de los conjugados proteínicos fluorofóricos es la rá-  
pida identificación de microorganismos y otros antígenos  
patogénicos con la ayuda de anticuerpos fluorescentes. Los  
procedimientos existentes para el marcado fluorescente



- de proteínas, por ejemplo, el marcado con fluorescein-iso-  
tiocianato (FITC) se basan en los fluoróforos con funciona-  
lidad reactiva que se enlazan de forma covalente con las  
proteínas. Sin embargo, esta metodología se ve obstaculiza-  
da por serias desventajas, que radican principalmente en la  
necesidad de proceder a la purificación extensiva para se-  
parar cualquier reactivo en exceso que, por otra parte, no  
debe interferir de forma específica los ensayos inmunológi-  
cos.
- 5.
10. Ahora se ha descubierto que los compuestos de la  
fórmula I no son fluorescentes pero reaccionan con materia-  
les que contienen grupos amínicos primarios para producir  
conjugados fluorescentes, evitándose así la molesta purifi-  
cación.
15. En la descripción y en las reivindicaciones ad-  
juntas, el término "alquilo inferior" significa un substi-  
tuyente hidrocarbúrico monovalente, saturado, de cadena li-  
neal o ramificada que contiene hasta 8 átomos de carbono  
inclusive. Ejemplos de grupos de alquilo inferior son meti-  
lo, etilo, n-propilo, n-butilo, hexilo, octilo, isopropilo,  
20. butilo terciario, etc. El término "fenil-alquilo inferior"  
hace referencia a un grupo de alquilo inferior tal como se  
ha definido anteriormente que está unido a un anillo feníli-  
co, por ejemplo bencilo, fenil-etilo, fenilpropilo, etc. El  
25. término "substituído" aplicado al fenilo, naftilo o indoli-  
lo se refiere a estos grupos substituídos con uno o más de  
los substituyentes siguientes: halógeno (por ejemplo, flúor,  
cloro, bromo o yodo), alquilo inferior, trifluorometilo,  
alcoxilo inferior, nitro y ciano. El término "alcoxilo in-



ferior" significa un grupo que tiene un radical de alquilo inferior enlazado a un oxígeno etéreo y que tiene su valencia unida a partir del oxígeno etéreo. Ejemplos de grupos de alcoxilo inferior son el metoxilo, el etoxilo, n-propoxilo, n-butoxilo, isopropoxilo, tercibutoxilo, etc.

Los compuestos preferidos de la fórmula I son aquellos en donde  $R_1$  es alquilo inferior y  $R_2$  y  $R_3$  son fenilo. Un compuesto particularmente preferido de la fórmula I es el compuesto en donde  $R_1$  es metilo y  $R_2$  y  $R_3$  son fenilo, por ejemplo, 2-metoxi-2,4-di-fenil-3(2 H)furanona.

Los compuestos de la fórmula II pueden prepararse siguiendo una secuencia sintética de etapas múltiples a partir de materiales de partida, fácilmente obtenibles, de la fórmula

15.



en donde

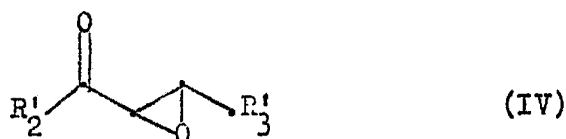
$R_2'$  y  $R_3'$  tienen el significado indicado antes.

20.

Los compuestos de la fórmula III en donde  $R_2'$  y  $R_3'$  son fenilo o fenilo sustituido se les denomina generalmente benzalacetofenonas o benzalacetofenonas sustituidas.

En la primera etapa se epoxida el material de partida de la fórmula III, bajo condiciones básicas, para obtener una cetona epoxídica de la fórmula

25.



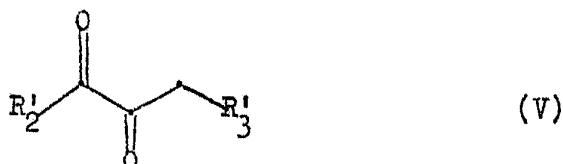


en la que

$R_2'$  y  $R_3'$  tienen el significado indicado antes.

- La reacción de epoxidación se lleva a cabo tratando un compuesto de la fórmula III con un exceso de peróxido de hidrógeno en presencia de una base fuerte. Las bases fuertes apropiadas para la presente reacción incluyen los hidróxidos de metal alcalino, por ejemplo, hidróxido sódico e hidróxido potásico; y carbonatos de metal alcalino, por ejemplo carbonato sódico y carbonato potásico.
5. Los disolventes apropiados para la reacción de epoxidación son alcoholes, particularmente metanol y etanol y mezclas acuosoalcohólicas. La reacción se lleva a cabo, por lo general, a temperaturas comprendidas entre unos 10 y unos 40°C., más preferentemente entre unos 20 y unos 30°C.
- 10.

15. En la etapa siguiente se trata el compuesto de la fórmula IV con una base anhidra fuerte para disociar el anillo epoxídico y proporcionar una dicetona de la fórmula



en la que

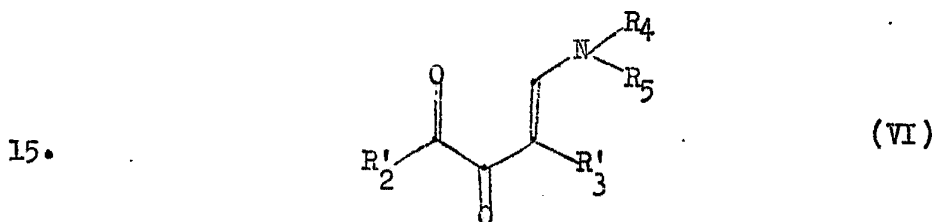
$R_2'$  y  $R_3'$  tienen el significado indicado antes.

- Las bases anhidras fuertes apropiadas para esta disociación incluyen los alcóxidos de metal alcalino, tal como el metóxido sódico, el etóxido sódico, el isopropóxido sódico, terciobutóxido potásico, etc. En calidad de disolventes apropiados para la reacción de disociación pueden citarse los alcoholes anhidros, por ejemplo, metanol, etanol, isopropanol y butanol terciario. Se prefiere utilizar, por
- 25.



lo general, el mismo alcohol del que se deriva la base alcóxídica; sin embargo, esto no es crítico, y en caso de que se utilice un alcohol distinto como disolvente se producirá un intercambio entre el disolvente alcohólico y la porción alcohólica del alcóxido de metal alcalino. La reacción de disociación se lleva a cabo, por lo general, a temperatura elevada, de preferencia comprendida entre unos 40 y unos 100°C., más preferentemente al punto de ebullición del medio reaccional.

5. En la etapa siguiente se convierte la dicetona de la fórmula V a una enamina de la fórmula



en la que

20.  $R'_2$  y  $R'_3$  tienen el significado indicado antes, y  $R_4$  y  $R_5$  tomados independientemente, son cada uno alquilo inferior y tomados junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros que tiene un heteroátomo adicional, a lo sumo, elegido del grupo constituido por nitrógeno y oxígeno.

25.

En esta reacción se hace reaccionar la dicetona de la fórmula V con un agente amino-metilante para proporcionar la enamina.

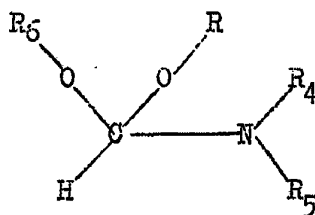


Los agentes amino-metenilantes apropiados incluyen los acetales de alquilo inferior de una formamida N,N-disustituida, por ejemplo, dimetilformamida-dimetilacetal; tris(amino secundario) metanos, por ejemplo tris(dimetil-amino)metano y tris(piperidino)metano; y bis(amino secundario) alcoxilo inferior-metanos, por ejemplo, bis(dimetil-amino)tercibutoxi-metano.

5.

La fracción amínica  $-N \begin{matrix} R_4 \\ R_5 \end{matrix}$ , tal como se representa en la fórmula estructural para el compuesto VI, se introduce a partir del agente aminometenilante. Los acetales de formamidas N,N-disustituidas tienen la fórmula general

10.

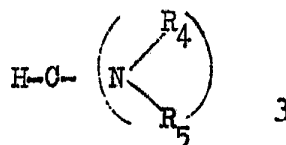


15.

en la que

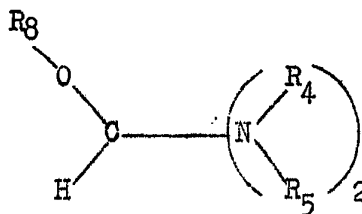
$R_6$  y  $R_7$  son, cada uno, alquilo inferior; los tris(amino secundario)metanos tienen la fórmula general

20.



y los bis(amino secundario)alcoxilo inferior-metanos tienen la fórmula general

25.





en la que

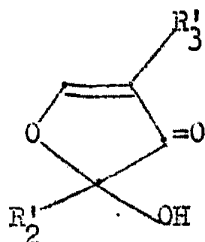
$R_3$  es alquilo inferior.

- Ejemplos de fracciones amínicas - N  $\begin{matrix} \swarrow R_4 \\ \searrow R_5 \end{matrix}$  incluyen aquellas donde  $R_4$  y  $R_5$ , tomados independientemente son, cada uno, alquilo inferior, por ejemplo, dimetilamino y dietilamino, y aquellas en donde  $R_4$  y  $R_5$  tomados junto con el nitrógeno forman un anillo heterocíclico con 5 o 6 miembros, por ejemplo, piperidino, morfolino, pirrolidino, piperacino, imidazolidino, pirazolidino, etc. Ejemplos de fracciones de alcoxilo inferior  $OR_6$  y  $OR_7$  son metoxilo, etoxilo, propoxilo, n-butoxilo, etc. Ejemplos de fracciones alcoxilicas inferiores  $OR_8$  son metoxilo, etoxilo, butoxilo terciario, etc.

- Esta reacción puede llevarse a cabo en cualquier disolvente orgánico inerte. Los disolventes preferidos incluyen las formamidas, especialmente la dimetilformamida. En calidad de disolvente puede utilizarse también un exceso de agente aminometilante.

- La preparación de la enamina puede llevarse a cabo a una temperatura comprendida entre alrededor de 0 y alrededor de 100°C., si bien se prefiere una temperatura comprendida entre unos 10 y unos 40°C. Se prefiere especialmente una temperatura próxima a la temperatura del ambiente.

- En la siguiente etapa se convierte la enamina de la fórmula VI en la hidroxifuranona de la fórmula



(VII)



en la que

$R_2'$  y  $R_3'$  tienen el significado indicado antes.

- Esta conversión implica una hidrólisis acuosa básica. Las bases apropiadas para esta hidrólisis incluyen los hidróxidos de metal alcalino, por ejemplo, hidróxido sódico e hidróxido potásico y los carbonatos de metal alcalino, por ejemplo, carbonato sódico y carbonato potásico. Las temperaturas apropiadas para llevar a cabo la reacción anterior están comprendidas entre alrededor de 0 y alrededor de 40° C., más preferentemente en torno de la temperatura del ambiente. Después de completada la hidrólisis, se neutraliza la solución básica para obtener la hidroxifuranona de la fórmula VII. Los compuestos de las fórmulas VI y VII, en donde  $R_2'$  y  $R_3'$  no son ambos fenilo, son nuevos.
15. Luego puede convertirse la hidroxifuranona de la fórmula VII en la furanona de la fórmula II mediante reacción con el alcohol apropiado, por ejemplo un alcohol de la fórmula  $R_1'OH$ , en donde  $R_1'$  tiene el significado expuesto en la fórmula II anterior. Este alcohol puede ser o bien un alcohol inferior o un fenil-alcohol inferior, tal como el metanol, etanol, alcohol bencílico, alcohol feneletílico, etc. En calidad de disolventes para esta reacción puede utilizarse el propio alcohol o una mezcla del alcohol y un disolvente orgánico inerte. Lo más preferible es llevar a cabo esta reacción en el alcohol deseado. La reacción puede llevarse a cabo, de forma apropiada, a temperaturas comprendidas entre alrededor de la temperatura del ambiente y alrededor del punto de ebullición del medio disolvente. De preferencia la reacción se lleva a cabo a temperaturas compren



didas entre unos 40 y unos 80°C.

- Los compuestos de la fórmula I pueden interconvertirse, por ejemplo, el grupo alcoxílico  $OR_1$  puede substituirse, mediante reacción del compuesto de la fórmula I, con un alcanol inferior apropiado o un fenil-alcanol inferior. Así pues, por ejemplo, el compuesto de la fórmula I, en donde  $R_1$  es metilo, puede convertirse en el compuesto respectivo en donde  $R_1$  sea bencilo calentando el primer compuesto con un exceso de alcohol bencílico.
- 5.
10. Los fluorógenos de la fórmula I son relativamente insolubles en agua y reaccionan lentamente con el agua para proporcionar productos de descomposición que no son fluorescentes. Los fluorógenos de la fórmula I son fácilmente solubles en disolventes orgánicos y son particularmente solubles en disolventes tales como la acetona y el diclorometano. Debido a que los compuestos tienen baja solubilidad en agua, cuando se desea que reaccionen con materias que estén presentes en el medio acuoso, ya sea en solución o en suspensión, es preferible adicionarlos en forma de una solución en un disolvente orgánico, más preferiblemente un disolvente orgánico miscible en agua tal como acetona, o bien llevar a cabo la reacción teniendo el compuesto de la fórmula I adsorbido en un soporte sólido. Esta última técnica de adsorción en un soporte sólido se prefiere, de forma particular, cuando se hace reaccionar el fluorógeno con materiales que son solubles en el medio acuoso, de forma que pueda separarse por filtración o centrifugación cualquier fluorógeno sin reaccionar de la fórmula I adsorbido en el soporte sólido. Los soportes sólidos
- 15.
- 20.
- 25.



- dos apropiados incluyen las materias inertes neutras, tales como tierra de diatomeas, polisacáridos, etc. Un soporte sólido particularmente preferido es la tierra de diatomeas. La adsorción del compuesto de la fórmula I en el soporte sólido puede llevarse a cabo con métodos de por sí conocidos, por ejemplo, suspendiendo el soporte sólido en una solución que contenga el compuesto de la fórmula I, por ejemplo, solución en acetona o cloruro de metileno, y evaporando el disolvente de dicha suspensión seguido de secado por aire o secado en vacío. Es más preferible preparar los soportes sólidos conteniendo de alrededor de 0,1 a alrededor del 5,0% en peso de compuestos de la fórmula I, más preferentemente de alrededor del 1 a alrededor del 2% en peso.
5. Los fluorógenos de la fórmula I reaccionan con materiales que contienen aminas primarias para formar productos fluorescentes. Los productos obtenidos con los materiales que contienen grupos amínicos primarios con uno o más de dos átomos de carbono son nuevos. Los tipos de materiales que pueden reaccionar con los fluorógenos de la fórmula I incluyen aminas primarias; aminoácidos; péptidos; proteínas, particularmente las de significación biológica, tales como inmunoglobulinas (anticuerpos); virus; organismos unicelulares, tales como bacterias, protozoos, algas y hongos; y organismos multicelulares, por ejemplo, helmin-  
10. tos como son las lombrices. El efecto de la reacción de un compuesto de la fórmula I con uno de los materiales antes indicados es el de introducir una marca fluorescente en dicho material. La introducción de la marca fluorescente  
15.  
20.  
25.



- permite la rápida identificación de dicho material utilizando la tecnología fluorescente, particularmente la microscopia fluorescente. El empleo del marcado fluorescente es particularmente importante en el campo de marcar proteínas, particularmente aquellas de importancia biológica como son los anticuerpos. Una ventaja principal de los compuestos del presente invento estriba en que no son fluorescentes por sí mismos, sino que al reaccionar con materiales que contienen grupos amínicos primarios producen material fluorescente. Además, al reaccionar con agua contenida en el medio reaccional, los compuestos de la fórmula I se descomponen en materiales que tampoco resultan fluorescentes. Así pues, se simplifica en gran manera la purificación y el aislamiento de los materiales marcados en forma fluorescente, debido a que no es necesario separar estos materiales de los reactivos fluorogénicos sin reaccionar o de sus productos de descomposición, como sucede con la técnica de marcado del arte anterior, tal como con el fluorescein-isotiocianato.
- Los materiales preferidos que pueden marcarse con los compuestos de la fórmula I se exponen en la tabla I que sigue :
- I. Microorganismos
- Bacterias
1. Cocos gram-positivos
    - Estreptococos (pyogenes, fecalis y viridans)
    - Estafilococos (aureus y albus)
    - Neumococos (D. pneumoniae)
  2. Cocos gram-negativos



- Neisseria (gonorrhoeae y meningitidis)
- 3. Bacilos aeróbicos gram-positivos
  - Bacillus anthracis
  - Cornebacterium diphtheriae
- 5. Erysipelothrix
- Idisteria monocytogenes
- 4. Bacilos anaeróbicos gram-positivos
  - Clostridia (botulinum, perfringens, welchii y tetani)
- 5. Bacilos anaeróbicos gram-negativos
- 10. Bacteroides
- 6. Bacilos intestinales gram-negativos
  - Escherichia
  - Klebsiella
  - Enterobacter
- 15. Proteus
- Pseudomonas
- Salmonella
- Shigella
- 7. Bacilos no intestinales gram-negativos
- 20. Pasteurella (pestis y tularensis)
- Hemophilus influenzae
- Brucella (militensis, abortus y suis)
- Bortadella pertussis
- Malleomyces
- 25. 8. Espiroquetas
  - Treponema pallidum
  - Leptospira
  - Borrelia
- 9. Micoplasma



10. Micobacteria

11. Vibrio

12. Actinomices

Protozoos

5. 1. Protozoos intestinales  
Ameabae
2. Flagelados  
Trichomonas  
Leishmania
10. Trypanosomes  
Toxoplasma
3. Esporozoos  
Plasmodia (vivax, falciparum, malariae y ovale)
4. Nematodos intestinales
15. Oxiuro  
Anquilostoma  
"Whipworms"
5. Nemátodos del tejido  
Trichinella
20. Filaria (Wuchereria bancroftii)  
Dracunculus
6. Trematodos  
Esquistosomas  
Lombrices intestinales
25. Lombrices del tejido
7. Cestoides  
tenias
8. Toxoplasma (T. gondii)



Hongos

1. Sprotrichum
2. Cryptococcus
3. Blastomyces
5. 4. Histoplasma
5. 5. Coccidioides
6. 6. Candida

Virus y organismos de Ricketts

1. Organismos de Ricketts
10. 2. Virus
  - Hepatitis canina
  - Papiloma "shope"
  - Influenza A y B
  - Plaga de las aves
15. Herpes simplex
- Adenovirus
- Polioma
- Sacromarous
- Vacuna
20. Virus de polio
- Sarampión
- Moquillo canino
- Leucemia
- Paratoditis
25. Enfermedad de Newcastle
- Sendai
- Eco
- Enfermedad de pies y boca
- Psitacosis



Rabia

Ectromelia

Virus de árbol

II. Antígenos foráneos

5. Polisacáridos  
Hialuronidasa  
Toxina del tétanos  
Ovalbúmina de huevo  
Albúmina de suero ovino
10. Gamma-globulina de plasma humano  
Albúmina de suero humano

III. Antígenos nativos

1. Hormonas

15. Hormonas pituitarias  
Insulina  
Glucagon  
Hormona tiroidea  
Gonadotropina coriónica  
Hormona del desarrollo coriónica-prolactina
- 20.

2. Enzimas

- Quimiotripsinógeno pancreático  
Procarboxipeptidasa  
Deoxirribonucleasa
25. Ribonucleasa  
Gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa  
Catalasa

3. Antígenos orgánicos específicos

Riñón



- Hígado
- Piel
- Corazón
- Tracto gastrointestinal
- 5. Próstata
- Antígenos embrionicos
- Antígenos tumorales
- 4. Componentes conectivos del tejido
- Músculo
- 10. Colágeno
- Amiloide
- 5. Antígenos celulares de la sangre, sustancias del grupo sanguíneo y otros isoantígenos.-
- Plaquetas
- 15. Megacariocitos
- Leucocitos
- Eritrocitos
- Substancias del grupo sanguíneo
- Antígenos de Forssman
- 20. Antígenos de histocompatibilidad
- 6. Proteínas de plasma
- Fibrina y fibrinoide
- Plasminógeno y plasmina
- 7. Globulinas patológicas
- 25. Mieloma, proteínas macroglobulinémicas y disglobulinémicas
- Factor reumatoide
- Proteína C reactiva



IV. Anticuerpos nativos

1. Gamma-globulina nativa

Anticuerpos nativos - anticuerpos nefrotóxicos

2. Autoanticuerpos

5.

Factor antinuclear

Autoanticuerpos tiroides

Autoanticuerpos adrenales

Autoanticuerpos para células parietales  
gástricas en anemia perniciosa

10.

Anticolon

Antihigado

Antirrifión

Anticuerpos para espermatozoos

Anticorazón

15.

Anticuerpos musculares en miastenia grave

Anticuerpos frente al tejido nervioso

Anticuerpos frente al tejido fibroso y

los componentes vasculares

Anticuerpos frente plaquetas y megacariocitos

20.

Anticuerpos frente trofoblastos.

3. Anticuerpos inducidos a:

Las clases de inmunoglobulina Igb, Igm, Iga  
de diferentes especies.

25.

Los materiales particularmente preferidos que  
pueden marcarse con los compuestos de la fórmula I son  
Hymenolepis nana, Escherichia coli, anticuerpos para pneumo-  
cocos del tipo II y gammaglobulina.

Se ha descubierto que la reacción de marcado fluo



- rescente, utilizando los compuestos de la fórmula I, depende en gran manera del pH. El marcado tiene lugar con una intensidad sustancial entre PHs de alrededor de 8,0 y 10,5. Una gama óptima de pH para llevar a cabo el marcado está
5. comprendida entre un pH de 9,0 aproximadamente y 9,5 aproximadamente. El pH puede controlarse con técnicas de por sí conocidas para regular el pH, incluyendo el empleo de amortiguadores. Sin embargo, debe evitarse, el empleo de amortiguadores que contengan grupos amínicos primarios
10. libres.
- La extensión del marcado de un substrato particular variará según la concentración de fluorógeno utilizada y el contacto total entre el fluorógeno y el substrato.
15. La extensión del marcado deseado para cualquier substrato particular y finalidad variará, evidentemente, según los casos. Se ha encontrado que, para la mayoría de los fines, el marcado extensivo puede lograrse con un tiempo de contacto comprendido entre 2 minutos y 2 horas, más
20. preferentemente entre unos 5 minutos y 30 minutos.
- La excitación fluorescente y el espectro de emisión para los materiales marcados variará también según sea la naturaleza del material. Como ejemplo puede citarse un espectro típico fluorescente para una fracción de
25. gamma-blogulina marcada con un compuesto de la fórmula I en donde existe dos máximos de excitación, a 290 y 390 nm, y un máximo de emisión a 480 nm.

Se ha encontrado, asimismo, que el marcado de



- substratos vivientes, tales como bacterias o tenias con los fluorógenos de la fórmula I puede producir escaso efecto, si lo produce, sobre su viabilidad. Así pues, el presente procedimiento proporciona un método eficaz para
5. el marcado de organismos vivientes. Se ha encontrado, asimismo, que el marcado de proteínas biológicamente importantes, como son los anticuerpos, produce escaso efecto, si es que lo produce, sobre sus propiedades biológicas. Por ejemplo, si se marcan en forma fluorescente anticuerpos
10. contra neumococos del tipo II, siguiendo la técnica precedente, permanece considerablemente inafectado el título del anticuerpo y, lo que es más importante, permanece inalterada la especificidad del anticuerpo. En este caso por ejemplo, los anticuerpos resultaron todavía específicos
15. para los neumococos del tipo II y no se enlazaron con los neumococos del tipo I.

- Una característica adicional de los materiales marcados, preparados según la técnica precedente, estriba en que éstos son sorprendentemente estables durante
20. prolongados períodos de tiempo, aún a la temperatura del ambiente y en presencia de luz. Así pues, existe reducida destrucción de la marca fluorescente introducida en una variedad de substratos, incluyendo substratos vivientes y
25. no vivientes durante períodos tan prolongados como un mes.

El presente invento puede comprenderse y apreciarse de forma más amplia con referencia a los ejemplos concretos que siguen.

#### EJEMPLO 1



5. Se adicionaron 100 cc de solución de hidróxido sódico 2N a una mezcla, agitada mecánicamente, de 83,2 g de benzalacetofenona (0,3 M), 1000 cc de metanol y 120 cc de peróxido de hidrógeno al 15%, mientras que se mantenía la temperatura por debajo de 30° mediante refrigeración externa. Después de completada la adición, se dejó en reposo la mezcla a la temperatura del ambiente durante 20 minutos. Se separó por filtración el precipitado cristalino, se lavó con agua y se recristalizó en metanol. Se obtuvieron
10. 59,6 g de 1,3-difenil-2,3-epoxi-1-propanona; punto de fusión 90°C.

#### EJEMPLO 2

15. Se adicionó rápidamente una solución caliente de 30 g de terciбутóxido potásico en 500 cc de etanol a una solución de 30 g de 1,3-difenil-2,3-epoxi-1-propano en 500 cc de etanol. Se mantuvo en ebullición la mezcla en un baño de vapor durante 2 minutos. Luego se diluyó con 3 litros de agua. Se saturó la solución acuosa con dióxido de carbono mediante la adición de pequeños trozos de hielo seco. Se extrajo la emulsión resultante con éter. Si diluyeron los extractos etéreos con benceno, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron bajo presión reducida. La destilación en alto vacío del aceite oscuro restante dió 19,5 g de 1,3-difenil-1,2-propandiona; punto de ebullición 136-138°/0,1 mm.

25.

#### EJEMPLO 3

Se dejó reposar a la temperatura ambiente durante 2 horas una solución de 44,8 g de 1,3-difenil-1,2-propandiona en 90 cc de N,N-dimetilformamida-dimetilacetal. Se vertió luego en 1 litro de hielo/agua. Se extrajo la mezcla



- acuosa tres veces con éter. Se lavaron los extractos combinados con agua, se diluyeron con benceno, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron bajo presión reducida. La cristalización del residuo oleoso resultante en éter/éter
5. de petróleo, dió 40,2 g del producto deseado. La concentración de las aguas madres y la adición de éter de petróleo proporcionó una segunda cosecha de 3,1 g. En total se obtuvieron 43,3 g de 1-dimetilamino-2,4-difenil-1-buten-3,4-diona; punto de fusión 108°C.
10. EJEMPLO 4
- Se adicionaron 500 cc de hidróxido potásico acuoso al 2% a una solución de 43,3 g de 1-dimetilamino-3,4-difenil-1-buten-3,4-diona en 500 cc de etanol. Se agitó la mezcla durante 2 horas a la temperatura del ambiente. Luego
15. se diluyó con 3 cc de agua y se acidificó con ácido clorhídrico al 10%. Se separó por filtración con succión la 2-hidroxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona sólida que precipitó. Se lavó la torta de filtración con agua y se disolvió (sin purificación adicional) con 500 cc de metanol. Se sometió a
20. reflujo, durante 2 horas, la solución metanólica, se concentró luego sobre el baño de vapor hasta, aproximadamente, 350 cc. Después de refrigeración se obtuvo el producto cristalino. Este producto se purificó adicionalmente recristalizándolo dos veces en metanol, lo que dió 25,5 g del material deseado; punto de fusión 93-95°C. Se combinaron las aguas
25. madres y se evaporaron. Se volvió a disolver el residuo en cloroformo y se filtró a través de 200 g de gel de sílice. Se evaporó el eluato y se recristalizó el residuo en etanol, lo que dió un producto adicional de 5,8 g; punto de fusión



93-95°C. En total se obtuvieron 31,3 g de 2-metoxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona, punto de fusión 93-95°C.

#### EJEMPLO 5

- Procediendo en la forma expuesta en los ejemplos 1 a 4 se prepararon los compuestos siguientes, incluyendo los intermediarios respectivos para su preparación:
5. 2-etoxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona, punto de fusión 87°C,
10. 2-benciloxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona, punto de fusión 140°C,
- 2-metoxi-2-fenil-4-(4-nitrofenil)-3(2 H)-furanona, punto de fusión 115-117°C.

#### EJEMPLO 6

- Procediendo en la forma expuesta en los ejemplos 1 a 4 pueden prepararse los compuestos siguientes :
15. 2-metoxi-2-fenil-4-(2-naftil)-3(2 H)-furanona;
- 2-metoxi-2-(4-clorofenil)-4-fenil-3(2 H)-furanona,
- 2-etoxi-2-(2,4-dimetoxifenil)-4-(3-indolil)-3(2 H)-furanona,
20. 2-metoxi-2-fenil-4(2-trifluorometilfenil)-3(2 H)-furanona,

#### EJEMPLO 7

- Se tificaron durante 10 minutos, a 22-26°C, tenias de ratón (Hymenolepis nana) en 9 cc de tampón acuoso, pH 9,5, mediante la adición de 1 cc de solución acetónica (de diversas concentraciones) de 2-metoxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona. Se separó el colorante en exceso lavando los gusanos en el medio de cultivo HME (medio basal de águilas). La intensidad de la fluorescencia, estimada so-
- 25.



5. bre una escala arbitraria que va desde no tinción (0) hasta tinción máxima (1,00), se determinó utilizando un microscopio de American Optical Fluorescent al cabo de 1 hora, 22 horas y 8 días después de la tinción. Estos resultados se exponen a continuación. La morfología general y la actividad de los gusanos resultó inafectada por el procedimiento de tinción.

	<u>Concentración mg/cc</u>	<u>Tiempo de post-tinción</u>		
		1 hora	22 horas	8 días
10.	0,0	0,06	0,06	0,06
	0,5	0,37	0,37	0,50
	0,1	0,67	0,67	-
	0.2	0,75	0,75	0,67

EJEMPLO 8

15. Se suspendió Escherichia coli en 9 cc de solución salina amortiguada con borato, pH 9,5, y se tiñó durante 30 a 60 minutos, a la temperatura del ambiente, mediante la adición de 1 cc de solución acetónica (de diversas concentraciones) de 2-metoxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona. Se separó el colorante en exceso por centrifugación, se suspendieron las bacterias en solución salina, se guardó a 40°C y se examinaron las muestras por lo que respecta a la fluorescencia al cabo de 24 horas, 8 días y 16 días de la tinción. La viabilidad de la célula se estimó 22 horas después de la tinción mediante una técnica corriente de contado de placas. La intensidad de la tinción se juzgó tomando como base una escala arbitraria que va desde no tinción (0) hasta tinción máxima (1,00). Los resultados se exponen a continuación :

20.

25.



Conc. ng/cc	Tiempo de post-tinción			Viabilidad de la célula
	1 día	8 días	16 días	
0,0	0,00	0,00	0,00	$2 \times 10^8$
0,05	0,67	0,67	0,67	-
0,1	1,00	0,87	0,87	$7 \times 10^6$
0,2	1,00	1,00	0,87	$4,5 \times 10^5$

EJEMPLO 9

- Se diluyó en tampón, pH 9,0 suero antineumococo de conejo del tipo II específico y se hizo reaccionar durante 10 minutos, a la temperatura del ambiente, con celite (tierra de diatomeas) conteniendo el 1% o el 2% peso/peso de 2-metoxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona. Luego se separó el celite por filtración o centrifugación y se guardó el suero marcado a 4°C. La suspensión salina de neumococos del tipo II se dispuso sobre el portaobjetos del microscopio. Las bacterias, después de secadas por aire, se fijaron al portaobjetos mediante calor y se tificaron con antisuero del tipo II marcado durante 10 a 30 minutos, a la temperatura del ambiente. Se separó el antisuero en exceso lavando el portaobjetos con solución salina y se determinó la fluorescencia mediante inmersión directa en aceite. La intensidad de la tinción se midió al cabo de 10,25 y 31 días después del marcado y se juzgó tomando como base una escala arbitraria que va desde no tinción (0) hasta máxima tinción (1,00).

Los resultados se exponen a continuación :



	<u>Tiempo de post marcado (días)</u>	<u>Dilución del suero marcado</u>	
		<u>1:10</u>	<u>1:100</u>
		<u>Intensidad de la tinción</u>	
	0	0,87	-
	10	0,75	1,00
5.	25	0,75	-
	31	0,87	1,00

Quando los neumococos del tipo I se utilizaron en calidad de antígenos no se observó fluorescencia, indicando ello que se conservó la especificidad inmunológica.

10. El efecto del marcado sobre el título del anti-cuerpo se determinó siguiendo las pruebas inmunológicas corrientes. Los resultados se exponen a continuación. El título se expresa como el recíproco de la última dilución de suero dando una reacción positiva.

15.	<u>Prueba inmunológica</u>	<u>Título</u>	
		<u>marcado/suero</u>	<u>sin marcar/suero</u>
	Reacción de Quellung	100	80
	Aglutinación en el porta- objetos de latex	400	320-640
	Microscopio fluorescente :		
20.	14 días después del marcado	640-1280	0
	31 días después del marcado	400-800	0

EJEMPLO 10

Se disolvieron 50 mg de gamma-globulina (caballo, pureza > 98%) en 500 cc de tampones 0,05 M de pH variable.

25. Se adicionaron 200 mg de celite conteniendo 2% peso/peso de 2-metoxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona (preparado tratando 10 g de celite con una solución de 200 mg de la furanona en acetona y evaporando hasta sequedad). Después de agitar magnéticamente a la temperatura del ambiente, se filtró



la mezcla a través de un fino embudo, se congeló el filtrado en hielo seco-acetona y se guardó en un congelador. La fluorescencia se midió después de centrifugación, La fluorescencia relativa se ofrece en unidades arbitrarias.

	<u>pH</u>	<u>fluorescencia relativa</u>
5.	8,00	4
	8,35	9,5
	8,50	16
	8,83	33
10.	9,00	46
	9,31	75
	9,50	80,5
	9,75	84
	10,06	89

15. Después de dejar en reposo las soluciones durante 3 días a la temperatura del ambiente se obtuvieron los mismos resultados.

#### EJEMPLO 11

20. Se marcan 20 cc de soluciones al 1% de gamma-globulina (caballo, > 98 %) en tampón, pH 9,00 o 9,50, por tratamiento con 200 mg de celite conteniendo 2% peso/peso de 2-metoxi-2,4-difenil-3(2 H)-furanona a la temperatura del ambiente, durante 10 minutos. Se neutralizaron inmediatamente las soluciones hasta pH 7,00 con HCl 1 N, se centrifugaron y se guardó el sobrenadante a la temperatura del ambiente. La fluorescencia relativa se midió (activación 390 nm, emisión 484 nm) a varios intervalos y se ofrece en unidades arbitrarias.

423853



pH 9,00

	<u>Dias de post marcado</u>	<u>fluorescencia relativa</u>
	0	56,0
	1	56,0
5.	2	55,5
	3	56,0
	4	57,0
	6	-
	8	55,0
10.	11	

pH 9,50

	<u>Dias de post marcado</u>	<u>fluorescencia relativa</u>
	0	89,5
	1	89,0
15.	2	88,0
	4	88,0
	6	89,0
	8	-
	11	86,0

20. 3 - pH 9,50  
fluorescencia relativa

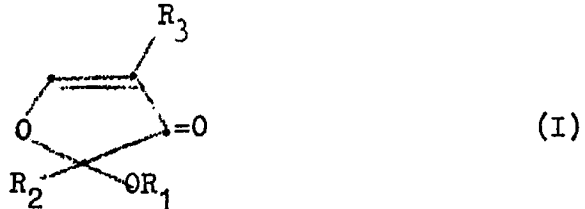
REIVINDICACIONES

25. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente U.S.A. núm. 338.019 del 5 de marzo de 1973.

1.- Un método para marcar de forma fluorescente un material conteniendo un grupo amínico primario, que com-



prende tratar dicho material con un compuesto de la fórmula



5.

en la que

R<sub>1</sub> es alquilo inferior o fenil-alquilo inferior,

R<sub>2</sub> es fenilo o fenilo sustituido y

R<sub>3</sub> es fenilo sustituido o insustituido, nafti-

10.

lo o indolilo,

en un medio acuoso a un pH comprendido entre 8,0 y 10,5.

2.- Un método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque preferentemente el pH del medio acuoso en que se verifica el tratamiento, está comprendido entre 9,0 y 9,5.

15.

3.- Un método, de conformidad con la reivindicación 1 o la 2, caracterizado porque el material que se marca es una proteína.

20.

4.- Un método, de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la citada proteína es un anticuerpo.

25.

5.- Un método, de conformidad con la reivindicación 1 o la 2, caracterizado porque así mismo el material con grupo amínico primario que se marca es un organismo unicelular o multicelular.

6.- Un método, de conformidad con la reivindicación 1 o la 2, caracterizado porque también el material amínico que se marca es Hymenolepis nana.



- 7.- Un método, de conformidad con la reivindicación 1 o la 2, caracterizado porque también el material amínico que se marca es *Escherichia coli*.
5. 8.- Un método, de conformidad con la reivindicación 1 o la 2, caracterizado porque del mismo modo el material amínico que se marca es un anticuerpo para neumococos del tipo II.
- 9.- Un método, de conformidad con la reivindicación 1 o la 2, caracterizado porque asimismo el material que se marca es un gammaglobulina.
10. 10.- Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque especialmente el compuesto reactivo de la fórmula I indicado es 2-metoxi-2,4-difenil-3(2H)-furanona.
15. 11.- Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque también especialmente el compuesto reactivo de la fórmula I es 2-benciloxi-2,4-difenil-3-(2H)-furanona.
- 12.- Un método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el compuesto reactivo de la fórmula I se adsorbe eventualmente sobre un soporte sólido inerte, con el que se verifica del mismo modo la reacción con los citados materiales con grupo amínico primario.
20. 12.- Un método, de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque dicho soporte sólido es tierra de diatomeas.
25. 13.- Un método, de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque dicho soporte sólido es tierra de diatomeas.
- 14.- Un método para marcar de forma fluorescente



un material conteniendo un grupo amínico primario.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 32 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

5.

Madrid, a 4 Marzo 1974

p.a.

JAIMÉ IZQUIERDO

p.p.

Firmado: JOSE L. MORA