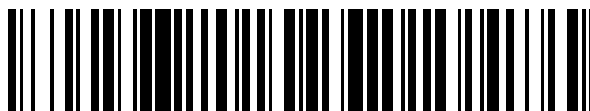


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 459**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/00** (2006.01)  
**A61M 36/14** (2006.01)  
**C07F 9/572** (2006.01)  
**C07F 9/6558** (2006.01)  
**C07F 9/6561** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010 E 10775385 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2429591**

54 Título: **Compuestos de éter de fosfolípido fluorescentes, composiciones y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**11.05.2009 US 463983**  
**11.05.2009 US 463978**  
**11.05.2009 US 463970**  
**11.05.2009 US 463990**  
**11.05.2009 US 463998**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.10.2015**

73 Titular/es:

**CELLECTAR, INC. (100.0%)**  
**3301 Agriculture Drive**  
**Madison, WI 53716, US**

72 Inventor/es:

**PINCHUK, ANATOLY;**  
**WEICHERT, JAMEY, P.;**  
**LONGINO, MARC;**  
**KANDELA, IRAWATI y**  
**CLARKE, WILLIAM, R.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 549 459 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

Compuestos de éter de fosfolípido fluorescentes, composiciones y procedimientos de uso

**Campo de la invención**

- 5 La invención se refiere generalmente a compuestos de éter de fosfolípido fluorescente selectivos de tumor (PLE), a composiciones que comprenden estos compuestos y al uso de estos compuestos y composiciones en diversas aplicaciones de diagnóstico.

**Antecedentes**

- 10 Se sabe que la detección precoz de tumores conduce a la mejora de la supervivencia a largo plazo. Por lo tanto, el desarrollo de técnicas de diagnóstico de tumores más selectivas y no invasivas es una alta prioridad. Las imágenes fluorescentes han probado que son una herramienta eficaz para la investigación del cáncer preclínica, el descubrimiento de fármacos antitumorales y desarrollos farmacológicos al proporcionar imágenes de la biodistribución de los marcadores fluorescentes. Marcando regiones de interés con sondas moleculares fluorescentes específicas de tumor, esta técnica permite la visualización de la ubicación y las geometrías de las zonas malignas.

- 15 Las barreras fundamentales a la imagen óptica en el tejido son una dispersión alta de la luz, autofluorescencia y alta absorción por la hemoglobina en la banda de media visible. El uso de la luz roja y en el infrarrojo cercano es la etapa más básica hacia la mejora de la imagen. El desplazamiento a longitudes de onda del infrarrojo cercano (700-1100 nm) confiere otras ventajas para la formación de imágenes de tejidos de mamíferos: se excita menos fluorescencia de fondo, ya que la autofluorescencia en los tejidos se excita principalmente mediante luz en el ultravioleta cercano y luz azul; y menos autofluorescencia interfiere, ya que la fluorescencia de la mayoría de los tejidos de mamíferos alcanza un pico en el amarillo y es muy baja más allá de 650 nm. (Ballou B, Ernst LA, Waggoner AS. *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 795 – 805; Fabian J, Nakazumi H, Matsuoka M. *Chem. Rev.*, 1992, 92, 1197 – 1226). El uso de la fluorescencia en el IR cercano mejora en muchos aspectos la realización de ensayos biológicos basados en fluorescencia. Por ejemplo, la fluorescencia en el IR cercano proporciona: 1) reducción significativa de la autofluorescencia de fondo; 2) la penetración de la luz más profunda; 3) fotodaño mínimo al tejido biológico; 4) una menor sensibilidad a las propiedades ópticas de los medios. Un buen marcador fluorescente debe tener un gran coeficiente de extinción, rendimiento cuántico fluorescente alto y alta fotoestabilidad.

- 20 La endoscopia, en particular, la colonoscopia y la broncoscopia, se utiliza para encontrar un crecimiento anormal y tumores que sobresalen en el lumen. Un dispositivo, llamado endoscopio, se inserta en una cavidad corporal. Tradicionalmente, los endoscopios utilizan un canal de la luz del día, es decir, el observador ve todo hallazgo en la longitud de onda de la luz natural.

- 25 Últimamente, los nuevos endoscopios tienen la capacidad de utilizar varios canales, es decir, un canal de luz del día y uno o más canales adicionales en otras longitudes de onda de luz. Estos canales adicionales se utilizan para monitorizar la fluorescencia de origen natural o la fluorescencia de un colorante que se inyectó en el cuerpo o se pulverizó sobre la superficie de la cavidad corporal. Uno de los posibles canales está en el área del NIR (infrarrojo cercano). La ventaja de la zona NIR es que la absorción de la luz de iones de la zona NIR (por lo general 600 - 800 nm) es mínima, y la fluorescencia se puede detectar a una profundidad de unos pocos milímetros a casi un centímetro bajo la superficie de la cavidad corporal. Se cree que esto tiene ventajas de detectar tumores y metástasis en los ganglios linfáticos en órganos tales como el colon y los pulmones.

- 40 De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de estudiar más a fondo los usos de la fluorescencia de infrarrojo cercano en la detección de neoplasias malignas durante el proceso endoscópico.

El documento US 2008/075660 se publicó el 27 de marzo de 2008, y se titula: "Fluorescencia en el infrarrojo cercano utilizando colorantes análogos a éter de fosfolípido en aplicaciones endoscópicas".

- 45 Hornillos V., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 18(24):6336 – 6339 (2008) se titular: "Síntesis de alquilfosfolinas marcadas con BODIPY con actividad leishmanicida como análogos fluorescentes de miltefosina".

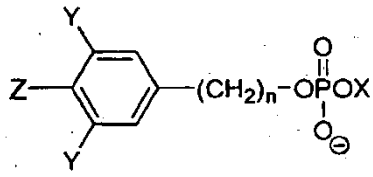
**Sumario de la invención**

La invención se refiere generalmente a compuestos de éter de fosfolípido (PLE) fluorescentes selectivos de tumor (PLE), a composiciones que comprenden estos compuestos y al uso de estos compuestos y/o composiciones en el diagnóstico de diversas neoplasias malignas.

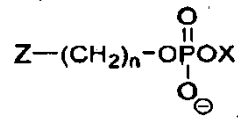
- 50 En un aspecto, la invención se refiere a compuestos como se define en las reivindicaciones.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a compuestos fluorescentes de fosfolípido de acuerdo con las fórmulas (I)-(II):

FÓRMULA I

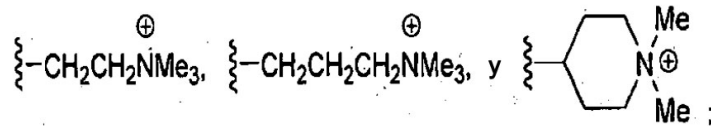


FÓRMULA II



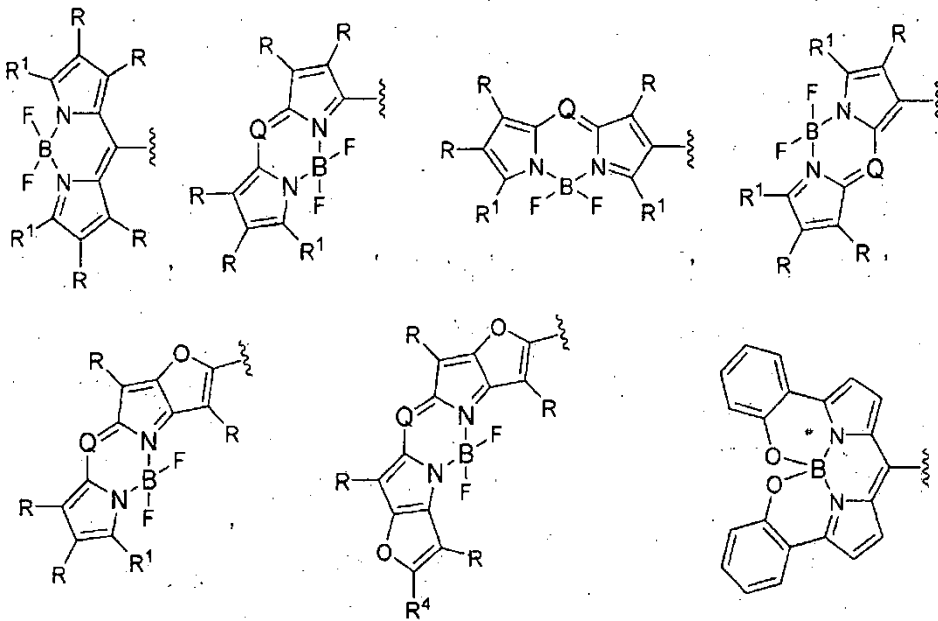
5

en la que n es un número entero entre 7 y 23;  
 Y es H, Me o Et;  
 X se selecciona del grupo que consiste en



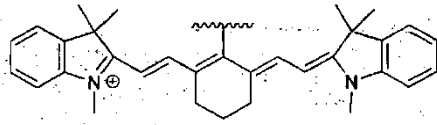
10

y  
 Z es un fluoróforo seleccionado de los siguientes:



15

y

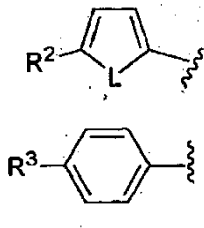


en la que

R se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Br y I.

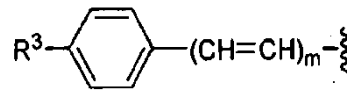
5 Q se selecciona del grupo que consiste en N, CH, C-Me, C-Et, C-CF<sub>3</sub>, C-Ph

R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en



10

y



15 L se selecciona del grupo que consiste en O, S, NH y NMe;

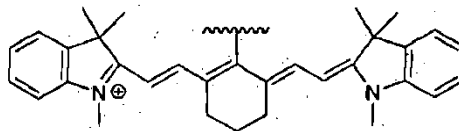
R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, y Et;

R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, OMe, Oet y NMe<sub>2</sub>;

R<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Ph o p-metoxi-fenilo; y

m es un número entero de 1 a 5,

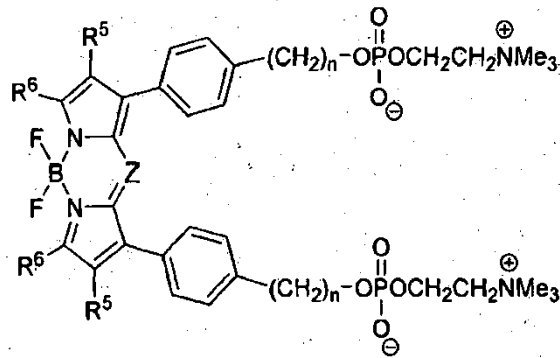
20



(u otros fluoróforos de carga positiva) pueden incluir también un contraion de carga negativa, tal como Cl<sup>-</sup>. Los inventores también divulgan compuestos de las fórmulas (III) a (VI).

25

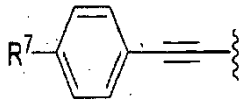
FÓRMULA III



en la que

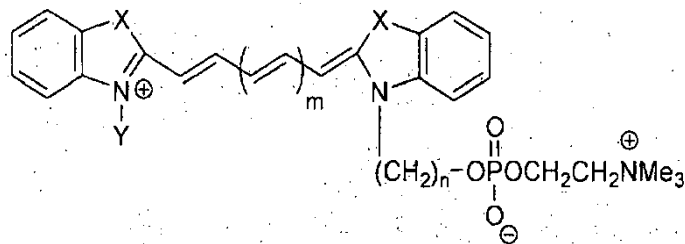
R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Br y I;

- 5 R<sup>6</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, *p*-metoxi-fenilo, *p*-(*N,N*-dimetilamino)-fenilo y



- 10 en la que R<sup>7</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, OMe, y Me<sub>2</sub>N.

FÓRMULA IV



15 en la que

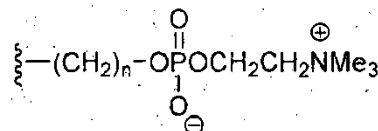
*n* es un número entero entre 7 y 23;

*m* es un número entero entre 0 y 4;

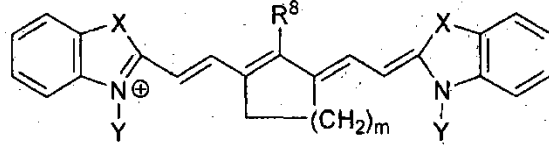
X se selecciona del grupo que consiste en O, S, CMe<sub>2</sub> y C=CH<sub>2</sub>;

Y se selecciona del grupo que consiste en Me, Et, Pr, *i*-Pr y

20

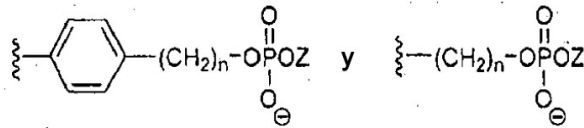


**FÓRMULA V**



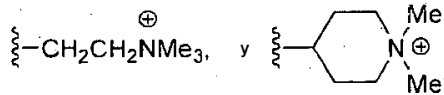
en la que

- 5 m es un número entero entre 0 y 4;  
 X se selecciona del grupo que consiste en O, S, CMe<sub>2</sub> y C=CH<sub>2</sub>;  
 Y se selecciona del grupo que consiste en Me, Et, Pr y i-Pr;  
 R<sup>8</sup> se selecciona del grupo que consiste en



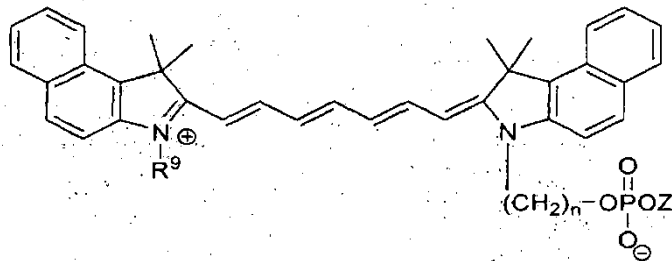
10

en el que n es un número entero entre 7 y 23; y  
 Z se selecciona del grupo que consiste en:



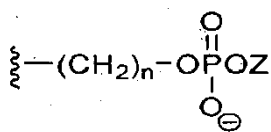
15

**FÓRMULA VI**

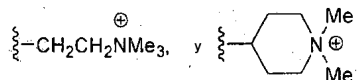


en la que

- 20 n es un número entero entre 7 y 23  
 R<sup>9</sup> se selecciona del grupo constituido por Me, Et y

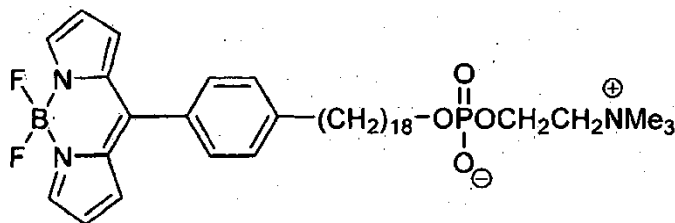


Z se selecciona del grupo que consiste en:



5

En una realización preferida, la invención se refiere a un compuesto que tiene una fórmula:



10

La invención también se refieren general a composiciones que comprenden los compuestos de la presente invención.

La invención también se refiere en general a compuestos de la presente invención para su uso en varios procedimientos, incluyendo, ente otros, determinación endoscópica de la presencia de neoplasia maligna interna; determinación visual y microscópica de la presencia de lesiones malignas sobre la piel; ayuda en la selección de tejidos para biopsia en las neoplasias malignas internas y de la piel; determinación de la presencia de neoplasias malignas internas y/o de la piel durante cirugías para ayudar a realizar la biopsia y/o en la resección quirúrgica de dichas neoplasias malignas.

15

### Breve descripción de las figuras

- 20 La FIG. 1a representa células de melanoma de piel (A375) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 1b representa células de piel normales (A375) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2a representa células de melanoma de piel (A375) tras 0,5 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2b representa células de melanoma de piel (A375) tras 1 horas de incubación con CLR1501;  
 25 La FIG. 2c representa células de adenocarcinoma colorrectal (HCT-116) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2d representa células de carcinoma de útero (MES SA/Dx5) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2e representa células de carcinoma pancreático (Mia Paca-2) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2f representa células de carcinoma pancreático (Panc-1) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 30 La FIG. 2g representa células de adenocarcinoma de ovarios (Ovcar-3) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2h representa células de adenocarcinoma de ovarios (Ovcar-3) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2i representa células de glioblastoma (U-87MG) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2j representa células de fibroblastos normales (NFA) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 35 La FIG. 2k representa células de carcinoma de células claras (Caki 2) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 2l representa células de adenocarcinoma de próstata (PC3) tras 24 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 3 representa células de glioblastoma (U-87MG) tras 48 horas de incubación con CLR1501;  
 La FIG. 4 representa colocalización de CLR1501 con células fibroblastos normales (NFA) y de adenocarcinoma de próstata (PC3);  
 40 La FIG. 5 representa colocalización de CLR1501 con células fibroblastos normales (NFA) y de carcinoma de células claras (Caki 2);  
 La FIG. 6 representa una imagen de un ratón atímico al que se ha inculado carcinoma pancreático e inyectado

una composición que comprende CLR1501;

La FIG. 7 representa imágenes de tumores escindidos de ratones a los que se ha inyectado CLR1501; La FIG. 8 representa la colocalización tumoral de CLR1502 en ratones portadores de tumores de carcinoma colorrectal humano HCT-116).

5 La FIG. 9 representa la colocalización tumoral de CLR1501 en ratones portadores del tumores de carcinoma pancreático sin piel (Panc-1).

La FIG. 10 representa la colocalización tumoral de CLR1501 en ratones portadores del tumores de carcinoma pancreático sin piel (Panc-1) como se muestra usando Kodak X-Sight 761.

**Descripción detallada de la invención**

10 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye grupos de hidrocarburos de cadena lineal y ramificada que contienen el número indicado de átomos de carbono, típicamente metilo, etilo y los grupos de butilo y propilo de cadena lineal y ramificada. La referencia a un grupo o resto individual, tal como "propilo", abarca únicamente el resto o grupo de cadena lineal. Se hace referencia específica a un isómero de cadena ramificada, tal como "isopropilo".

15 "Me" se refiere a metilo.

"Et" se refiere a etilo.

"Ph" se refiere a fenilo.

"Pr" se refiere a propilo.

"i-Pr" se refiere a iso-propilo.

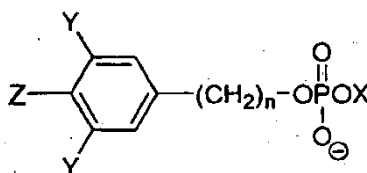
20 Los artículos en singular "uno/a", "un" y "el/la" incluyen la referencia en plural, a menos que se indique específicamente o a menos que esté claro por el contexto que solo es posible la forma en singular.

Las expresiones "compuesto éter de fosfolípido" y "compuesto de fosfolípido" se usan de forma intercambiable para los fines de la presente solicitud.

25 En una forma de realización, la presente invención se refiere en general a los compuestos de PLE fluorescentes y a su uso para la determinación de neoplasias malignas y otros usos.

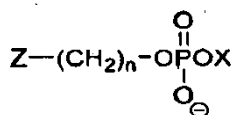
En una forma de realización, la invención se refiere generalmente a pigmentos fluorescentes de fosfolípidos de acuerdo con las fórmulas (I)-(II):

**FÓRMULA I**



30

**FÓRMULA II**

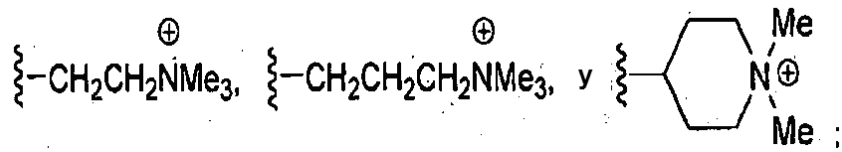


en el que n es un número entero entre 7 y 23;

Y es H, Me o Et;

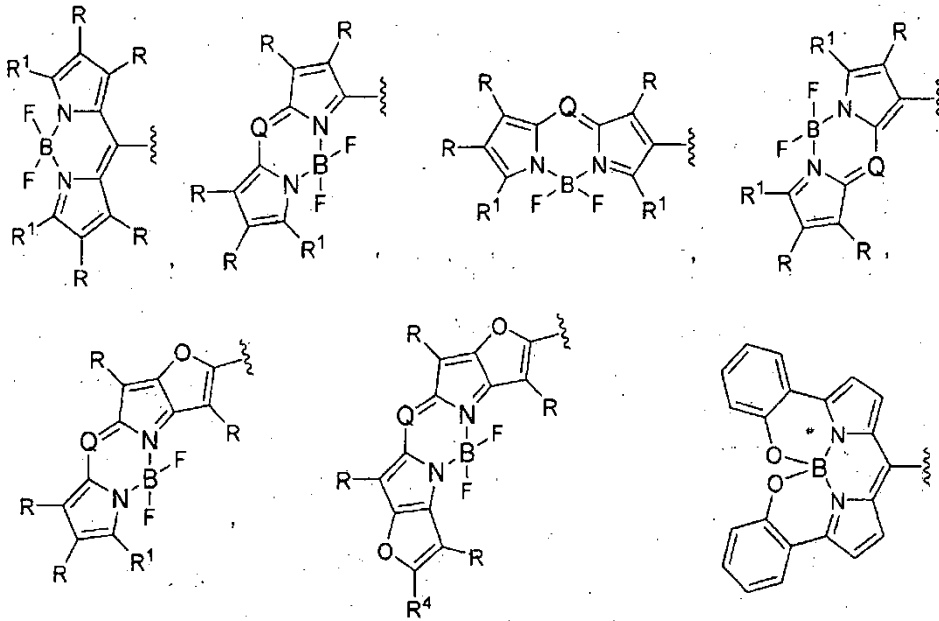
35 X se selecciona del grupo que consiste en



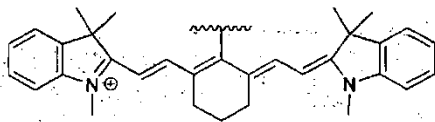


y  
Z es un fluoróforo seleccionado de los siguientes:

5



y



10

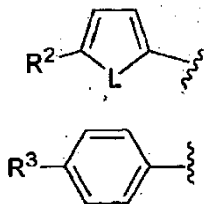
en la que

R se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Br y I.

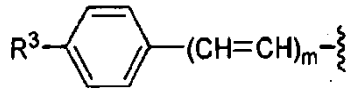
Q se selecciona del grupo que consiste en N, CH, C-Me, C-Et, C-CF<sub>3</sub>, C-Ph

R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en

15

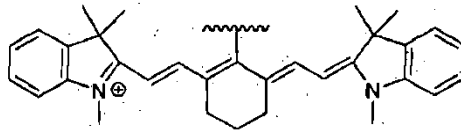


y



- 5 L se selecciona del grupo que consiste en O, S, NH y NMe;  
 R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, y Et;  
 R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, OMe, Oet y NMe<sub>2</sub>;  
 R<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Ph o *p*-metoxi-fenilo; y  
 m es un número entero de 1 a 5,

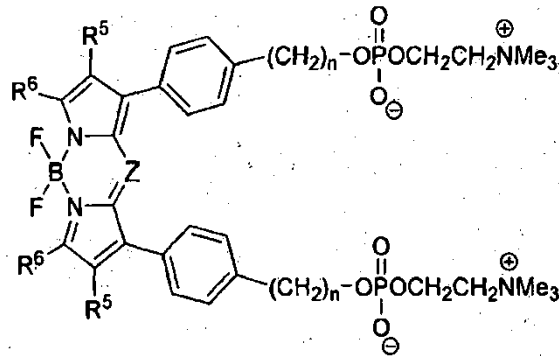
10



(u otros fluoróforos de carga positiva) pueden incluir también un contraion de carga negativa, tal como Cl<sup>-</sup>. Los inventores también divulgan compuestos de las fórmulas (III) a (VI).

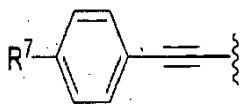
15

**FÓRMULA III**



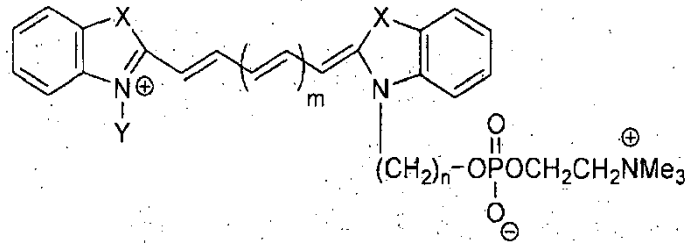
en la que

- R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Br y I;  
 20 R<sup>6</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, *p*-metoxi-fenilo,  
*p*-(*N,N*-dimetilamino)-fenilo y



- 25 en la que R<sup>7</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, OMe, y Me<sub>2</sub>N.

FÓRMULA IV



5 en la que

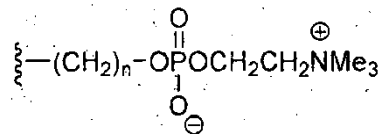
n es un número entero entre 7 y 23;

m es un número entero entre 0 y 4;

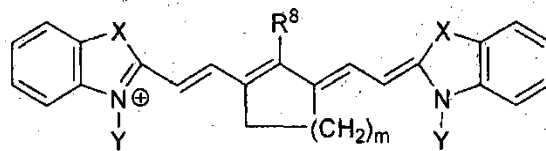
X se selecciona del grupo que consiste en O, S, CMe<sub>2</sub> y C=CH<sub>2</sub>;

Y se selecciona del grupo que consiste en Me, Et, Pr, i-Pr y

10



FÓRMULA V



15 en la que

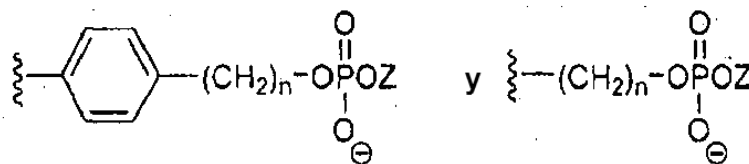
m es un número entero entre 0 y 4;

X se selecciona del grupo que consiste en O, S, CMe<sub>2</sub> y C=CH<sub>2</sub>;

Y se selecciona del grupo que consiste en Me, Et, Pr y i-Pr;

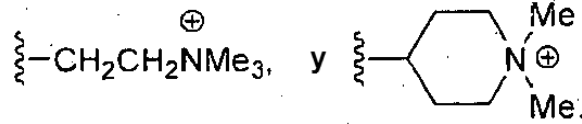
R<sup>8</sup> se selecciona del grupo que consiste en

20



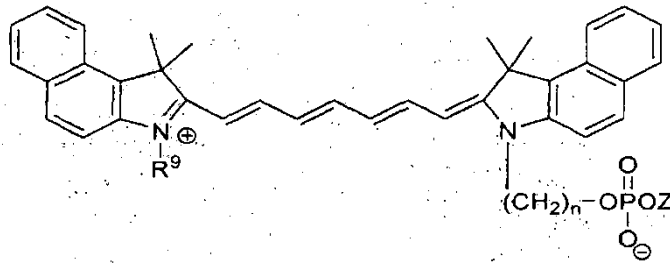
en el que n es un número entero entre 7 y 23; y

Z se selecciona del grupo que consiste en:



5

FÓRMULA VI

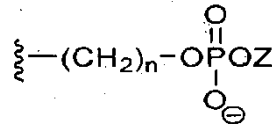


en la que

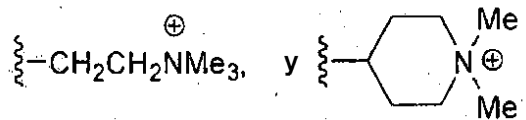
n es un número entero entre 7 y 23

R<sup>9</sup> se selecciona del grupo constituido por Me, Et y

10

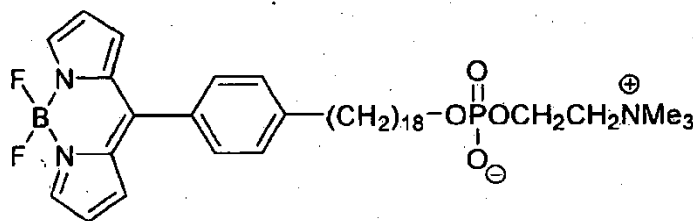


Z se selecciona del grupo que consiste en:

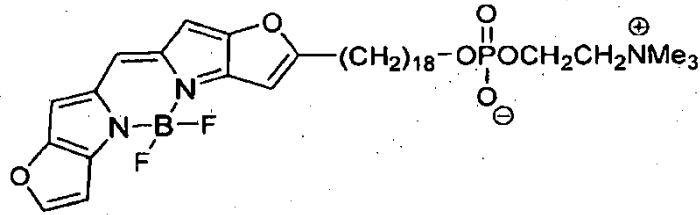
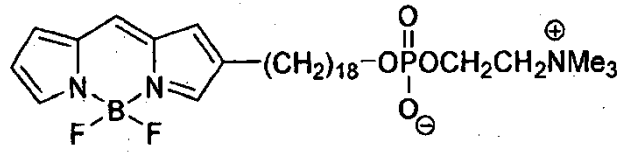


15

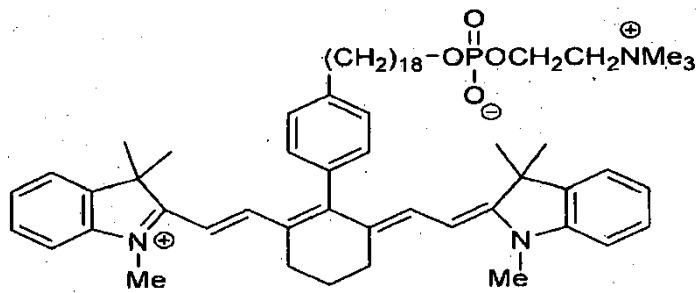
Los compuestos preferidos actualmente incluyen:



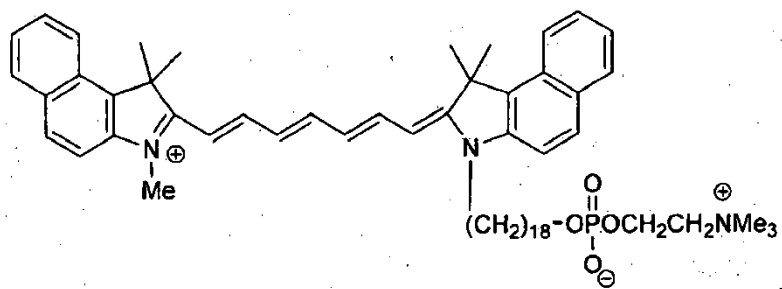
20



5 y



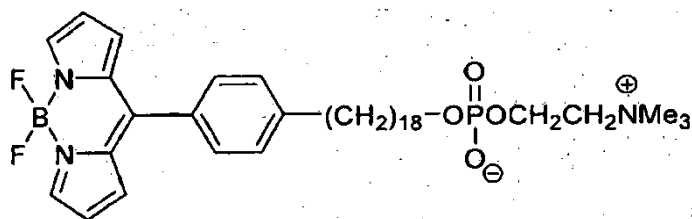
Los inventores también divulgan el compuesto siguiente:



10

Los compuestos particularmente preferidos son:

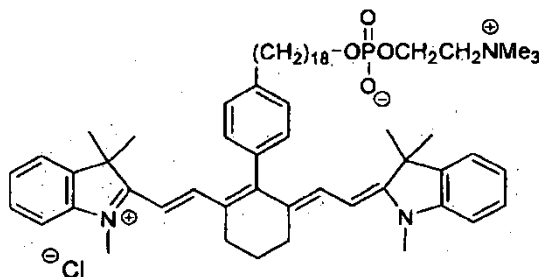
CLR1501:



y

CLR1502:

5



Debe entenderse que la presencia de contraiones (por ejemplo,  $\text{Cl}^\ominus$ ) es opcional y la invención abarca compuestos con y sin contraiones.

10 Los compuestos fluorescentes de acuerdo con la presente invención generalmente exhiben fluorescencia a una longitud de onda de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 1000 nm. En una realización, la primera longitud de onda es de aproximadamente 400 a aproximadamente 900. Asimismo, la segunda longitud de onda es de aproximadamente 400 a aproximadamente 1100 nm.

15 Debe entenderse que la presente invención abarca los compuestos en cualquier forma racémica, ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de los mismos. En una realización, los compuestos de fosfolípidos fluorescentes pueden incluir los isómeros (R) puros. En una realización, los compuestos de fosfolípidos fluorescentes pueden incluir los isómeros (S) puros. En otra realización, los compuestos de fosfolípidos fluorescentes pueden incluir una mezcla de los isómeros (R) y (S). En otra realización, los compuestos de fosfolípidos fluorescentes pueden incluir una mezcla racémica que comprende ambos isómeros (R) y (S). En la  
20 técnica se sabe bien cómo preparar formas ópticamente activas (por ejemplo, mediante resolución de la forma racémica mediante técnicas de recristalización, mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral o mediante separación cromatográfica usando una fase estacionaria quiral).

Los compuestos de la invención pueden existir en las formas no solvatada y solvatada, incluyendo las formas hidratadas, por ejemplo hemihidrato. En general, las formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente  
25 aceptables tales como agua, etanol y similares son equivalentes a las formas no solvatadas para los fines de la invención.

Preferentemente, los compuestos de la invención son ambifílicos.

Determinados compuestos de la invención también forman sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de adición de ácido. Por ejemplo, los átomos de nitrógeno pueden formar sales con ácidos. Los ejemplos de ácidos  
30 adecuados para la formación de sales son los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, cítrico, oxálico, malónico, salicílico, málico, fumárico, succínico, ascórbico, maleico, metanosulfónico y otros ácidos carboxílicos minerales bien conocidos por los expertos en la técnica. Las sales se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir una sal de la manera convencional. Las formas de base libre se pueden regenerar tratando la sal con una solución de base acuosa diluida adecuada, tal  
35 como hidróxido de carbonato sódico acuoso diluido, amoníaco y bicarbonato sódico. Las formas de base libre difieren de sus formas de sales respectivas algo en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero las sales de ácido son equivalentes a sus formas de base libre respectivas para los fines de la invención. (Véase, por ejemplo, S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 66: 1 – 19 (1977)).

Entre las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se incluyen sales de adición de ácido que pueden formarse mediante, por ejemplo, mezcla de una solución del compuesto de acuerdo  
40

con la invención con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Además, cuando los compuestos de la invención llevan un resto ácido, sus sales farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden incluir sales de metal alcalino, por ejemplo sales de sodio o de potasio; sales de metal alcalinotérreo, por ejemplo sales de calcio o de magnesio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados, por ejemplo sales de amonio cuaternario.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa las sales que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y que son proporcionales a una razonable proporción de beneficios/riesgos. En la técnica se conocen bien sales farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, M. Berge, et al. describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66: 1 et seq. Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen, entre otras, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmitoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-tosilato y undecanoato. Asimismo, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo, sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de arilquilo como bromuros de bencilo y fenitilo, y otros. De este modo se obtienen productos dispersables solubles en agua o en aceite. Ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico.

Se pueden preparar *in situ* sales de adición básicas durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de la presente invención haciendo reaccionar un resto que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoniaco, o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Entre las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se incluyen cationes basados en metales alcalinos y metales alcalino-térreos, tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares, y cationes de amonio cuaternario no tóxico y de amina, incluidos amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, trietilamonio, dietilamonio y etilamonio entre otros.

Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares.

Cuando los compuestos de acuerdo con la invención tienen al menos un centro asimétrico, pueden, en consecuencia, existir como enantiómeros. Cuando los compuestos de acuerdo con la invención poseen dos o más centros asimétricos, puede existir adicionalmente como diastereoisómeros. Se debe entender que todos estos isómeros y mezclas de los mismos en cualquier proporción están dentro del alcance de la presente invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden preparar a partir de compuestos fenólicos mediante tratamiento con bases inorgánicas, por ejemplo hidróxido sódico. Asimismo, se pueden preparar ésteres de los compuestos fenólicos con ácidos alifáticos y aromáticos, por ejemplo ésteres de ácido acético y ácido benzoico.

Una "cantidad diagnósticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para la detección selectiva de tumores, es suficiente para proporcionar una distinción detectable entre una estructura benigna y un tumor maligno. La "cantidad diagnósticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la afección a detectar, la gravedad o la afección, la edad y la salud relativa del sujeto, la ruta y la forma de administración, el juicio del profesional médico o veterinario encargado de la atención y otros factores.

Un compuesto de la presente invención se administra a un sujeto en una cantidad diagnósticamente eficaz. Un compuesto de la presente invención se puede administrar solo o como parte de una composición farmacéuticamente aceptable. Además, un compuesto o composición se pueden administrar de una vez, como, por ejemplo, mediante una inyección de bolo, múltiples veces, tales como mediante una serie de comprimidos, o se liberan de manera sustancialmente uniforme durante un período de tiempo, como, por ejemplo, usando liberación transdérmica. También se observa que la dosis del compuesto puede variarse con el tiempo. Un compuesto de la presente invención puede administrarse usando una formulación de liberación inmediata, una formulación de liberación controlada, o combinaciones de las mismas. El término "liberación controlada" incluye liberación sostenida, liberación retardada y combinaciones de las mismas. En realizaciones preferidas, un compuesto fosfolípido fluorescente de la presente invención se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una preparación farmacéutica para la administración parenteral.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aquello que es útil para preparar una composición farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica, y ni biológicamente ni de otra manera indeseable, e incluye aquello que es aceptable para uso farmacéutico veterinario así como para humano. Las expresiones "sales farmacéuticamente aceptables" o "profármacos", incluye las sales y profármacos de los compuestos que son, dentro del alcance del firme juicio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y que son proporcionales a una razonable proporción de beneficios/riesgos, y eficaces para su uso previsto, así como las formas zwitteriónicas, cuando es posible de los compuestos.

Como se define en el presente documento, "poner en contacto" significa que el compuesto fosfolípido fluorescente usando en la presente invención se introduce en una muestra que contenga células o tejido dentro de un tubo de ensayo, matraz, cultivo de tejido, circuito, matriz, placa, microplaca, capilar o similar, y se incubaba a una temperatura y durante un tiempo suficientes para permitir la unión del compuesto fosfolípido fluorescente a un receptor o su intercalado en una membrana. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para poner en contacto las muestras con el compuesto fosfolípido fluorescente u otros componentes de unión específica y pueden seleccionarse en función del tipo de protocolo de ensayo que vaya a emplear. Los procedimientos de incubación son también convencionales y bien conocidos para los expertos en la técnica.

En otra realización, la expresión "poner en contacto" significa que el compuesto fosfolípido fluorescente utilizado en la presente invención se introduce en un paciente que recibe tratamiento y se deja que el compuesto entre en contacto *in vivo*. En una realización adicional, la expresión "poner en contacto" significa que el compuesto fosfolípido fluorescente utilizado en la presente invención se introduce en un paciente que requiere detección selectiva de tumores y se deja que el compuesto entre en contacto *in vivo*.

La invención también se refieren general a composiciones que comprenden los compuestos de la presente invención.

El término "composición", tal como se usa en el presente documento, se pretende que comprenda un producto que comprende los ingredientes especificados (y en las cantidades especificadas, si se indica), así como cualquier producto que resulte, de forma directa o indirecta, de la combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

Las composiciones de la presente invención se puede preparar como una dosis individual unitaria o como una pluralidad de dosis individuales unitarias. Como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" significa una cantidad discreta de la composición que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un paciente o una fracción de la misma.

Como se usa en el presente documento, "composición farmacéutica" significa cantidades terapéuticamente eficaces del análogo de éter de fosfolípido específico de tumores junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes y adyuvantes adecuados, en conjunto denominados "vehículos farmacéuticamente aceptables". Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad diagnósticamente eficaz" se refieren a la cantidad de agente activo suficiente para producir un efecto deseado sin efectos secundarios adversos indebidos, tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica. La "cantidad eficaz" específica variará con factores tales como la afección particular que se esté diagnosticando, el estado físico del sujeto, la especie del sujeto, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados. Las cantidades efectivas óptimas las pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica con experimentación de rutina.

Las composiciones de la presente invención pueden ser líquidas o liofilizadas o desecadas de otro modo, e incluyen diluyentes de diverso contenido tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción en superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20™, Tween 80™, Pluronic F68™, , sales de ácidos biliares), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabilufito sódico), conservantes (por ejemplo, Thimerosal™, alcohol bencílico, parabenos), sustancias espesantes o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), unión covalente a polímeros, tales como polietilenglicol a la proteína, formación de complejos con iones metálicos o incorporación del material en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos, tales como ácido láctico, ácido poliglicólico, hidrogeles etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas eritrocitarios o esferoplastos). Dichas composiciones pueden influir sobre el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de la liberación *in vivo* y la velocidad del aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites).

En una realización preferida, las composiciones de la presente invención comprenden un compuesto de la invención presente, polisorbato, etanol y solución salina.

También están comprendidas en la invención procedimientos de administrar composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o polixaminas). Otras realizaciones de las composiciones incorporan formas particuladas de recubrimientos protectores, inhibidores de proteasa o potenciadores de la permeación para



varias vías de administración, incluidas las vías tópica, parenteral, pulmonar, nasal y oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, paracanceral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intravaginal, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal o intratumoral.

5 Además, como se usa en el presente documento, los “vehículos farmacéuticamente aceptables” son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, tampón fosfato 0,01-0,1 M, y, preferiblemente, 0,05 M, o bien solución salina al 0,9 %. Adicionalmente, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos  
10 incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, todas incluyendo medios salinos y tamponados.

Vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, cloruro sódico y dextrosa, Ringer lactato y aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes y reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes  
15 conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Las composiciones de liberación controlada o sostenida de acuerdo con la invención incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). La invención también incluye composiciones  
20 particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos frente a receptores específicos de tejidos, ligandos o antígenos, o acoplados a ligandos de receptores específicos de tejido. Otras realizaciones de las composiciones de acuerdo con la invención incorporan formas particuladas de recubrimientos protectores, inhibidores de proteasa o potenciadores de la permeación para varias vías de administración, incluidas las vías parenteral, pulmonar, nasal y oral.

Se sabe que los compuestos modificados por el enlace covalente de polímeros hidrosolubles, tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina muestran una semivida en sangre considerablemente mayor tras su inyección por vía  
25 intravenosa que la que muestran los compuestos sin modificar correspondientes (Abuchowski y col., 1981; Newmark y col., 1982; y Katre y col., 1987). Estas modificaciones también pueden incrementar la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminar la agregación, potenciar la estabilidad física y química del compuesto y reducir considerablemente la inmunogenicidad y la reactividad del compuesto. Como resultado, es posible alcanzar la actividad biológica in vivo deseada mediante la administración de estos aductos formados por el compuesto y el polímero en una menor frecuencia o a dosis más bajas que con el compuesto sin modificar.

La preparación farmacéutica puede comprender solamente el compuesto de fosfolípido fluorescente o bien incluir también un vehículo farmacéuticamente aceptable y puede estar en forma líquida o sólida, tales como comprimidos,  
35 polvos, cápsulas, pastillas, soluciones, suspensiones, elixires, emulsiones, geles, cremas o supositorios, incluidos los supositorios rectales y los uretrales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen gomas, almidones, azúcares, materiales celulósicos y mezclas de los mismos. La preparación farmacéutica que contiene el compuesto fosfolípido fluorescente puede administrarse a un paciente mediante, por ejemplo, implantación subcutánea de un gránulo. En una realización adicional, un gránulo proporciona la liberación controlada del análogo del éter de  
40 fosfolípido específico de tumor durante un periodo de tiempo. La preparación también puede administrarse por inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida, mediante administración oral de una preparación líquida o sólida, o mediante aplicación tópica. La administración también puede llevarse a cabo mediante un supositorio rectal o bien un supositorio uretral.

Las preparaciones farmacéuticas administrables mediante la invención se pueden preparar mediante procedimientos conocidos de disolución, mezcla, granulación o formación de comprimidos. Para administración oral, los análogos de éter de fosfolípido específicos de tumor o sus derivados fisiológicamente tolerados, tales como sales, ésteres, N-  
45 óxidos y similares, se mezclan con los aditivos habituales para este propósito, como vehículos, estabilizantes o diluyentes inertes, y se convierten mediante procedimientos habituales en una forma adecuada para su administración, como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura o blanda y soluciones acuosas, alcohólicas o soluciones oleosas. Ejemplos de vehículos inertes adecuados son bases de comprimidos convencionales, tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz, en combinación con aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz, gelatina, con agentes disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, o con un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio.

Ejemplos de vehículos o disolventes oleosos adecuados son aceites vegetales o animales, tales como aceite de girasol o aceite de hígado de pescado. Las preparaciones pueden realizarse tanto en forma de gránulos secos como húmedos. Para la administración parenteral (inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular), los  
55 análogos de éter de fosfolípido específicos de tumor o sus derivados fisiológicamente tolerados, tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares, se convierten en una solución, suspensión o emulsión, si se desea con las sustancias habituales adecuadas para este fin como, por ejemplo, solubilizantes u otras sustancias auxiliares. Ejemplos son:  
60 líquidos estériles, tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo u otros adyuvantes

farmacéuticamente aceptables. Aceites ilustrativos son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, son vehículos líquidos preferidos para soluciones inyectables agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol.

- 5 La preparación de composiciones farmacéuticas que contengan un componente activo es bien conocida en la técnica. Dichas composiciones se pueden preparar en forma de aerosoles administrados en la nasofaringe o bien como inyectables en forma de soluciones o suspensiones líquidas; sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolver o suspender en un líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. Los ingredientes terapéuticos activos se mezclan a menudo con excipientes que son farmacéuticamente  
10 aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos.

Además, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH que potencian la eficacia del principio activo.

#### Procedimientos de uso

- 15 Los compuestos de la presente invención se pueden usar en una variedad de procedimientos de diagnóstico y terapéuticos.

En una realización, los compuestos pueden administrarse al paciente por las vías enteral o parenteral (es decir, por vía oral o vía IV) para la determinación endoscópica de la presencia de neoplasia maligna interna. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, diagnóstico endoscópico de neoplasia maligna en el colon, recto, intestino delgado,  
20 esófago, estómago, duodeno, útero, páncreas y el conducto biliar común, bronquios, esófago, boca, seno, pulmón, vejiga urinaria, riñón, cavidad abdominal o cavidad torácica (pecho).

En una realización preferida, la invención proporciona un compuesto para su uso en un procedimiento para distinguir endoscópicamente un tejido benigno de un tejido maligno en una región seleccionada mediante el uso de un endoscopio que tiene al menos dos longitudes de onda en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: (a) administrar un compuesto marcado con fluorescencia al paciente; (b) utilizar una primera técnica para producir una visualización de la anatomía de la región seleccionada utilizando la primera longitud de onda de un endoscopio; (c) usar una segunda técnica para producir una visualización de la distribución de la fluorescencia producida por el compuesto marcado con fluorescencia; y (d) comparar la visualización de la anatomía de la región seleccionada por la primera longitud de onda con la visualización de la distribución de la fluorescencia por la segunda longitud de onda producida por el compuesto marcado con fluorescencia distinguiendo de este modo un tejido benigno de tejido maligno. En esta realización, preferiblemente, la región seleccionada es el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio. Preferiblemente, un compuesto fosfolípido fluorescente se inyecta por vía intravenosa un par de horas antes de realizar exámenes endoscópicos; más preferiblemente de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas.

- 35 En otra realización, los compuestos se pueden usar para ayudar en la selección de los tejidos de biopsia en las neoplasias malignas internas enumeradas anteriormente.

En otra realización más, los compuestos se pueden administrar al paciente por las vías enteral o parenteral o por medio de aplicación tópica para la determinación visual y / o asistida con microscopio de la presencia de lesiones malignas en la piel. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, la diferenciación entre lesiones benignas y malignas en la piel.  
40

En otra realización, los compuestos se pueden usar para ayudar en la selección de los tejidos de biopsia en las neoplasias malignas en la piel enumeradas anteriormente.

En una realización, la invención se refiere en general a un compuesto para su uso en un procedimiento de selección de un tejido de biopsia en una región que se sospecha que tiene una neoplasia maligna, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar a un paciente un compuesto de éter fosfolípido fluorescente; (b) utilizar una primera técnica para producir una visualización de la anatomía de dicha región sospechosa de tener dicha neoplasia maligna utilizando la primera longitud de onda de un endoscopio; (c) utilizar una segunda técnica para producir una visualización de la distribución de la fluorescencia producida por el compuesto de éter fosfolípido fluorescente; y (d) comparar la visualización de la anatomía de dicha región sospechosa de tener dicha neoplasia maligna mediante la primera longitud de onda con la visualización de la distribución de la fluorescencia mediante la segunda longitud de onda producida por el compuesto de éter fosfolípido fluorescente, de modo que se distingue un tejido benigno de un tejido maligno y se permite elegir el tejido de la biopsia.  
45  
50

En otra realización más, los compuestos se pueden usar para ayudar en la determinación de márgenes de tejido maligno durante la resección operativa o cirugía de Mohs de dicha lesión.

- 55 En otra realización, los compuestos se pueden administrar al paciente por las vías enteral o parenteral (es decir, por vía oral o IV) para la determinación visual y/o asistida por microscopio de la presencia de tejido maligno en los bordes de las neoplasias malignas conocidas durante la cirugía. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la

determinación intraoperatoria de los bordes de una neoplasia maligna para ayudar a la biopsia completa y / o a la resección quirúrgica de dicha neoplasia maligna. Estos procedimientos se pueden usar para cualquier neoplasia maligna en cualquier tejido del cuerpo humano.

- 5 En otra realización más, los compuestos se pueden usar para determinar la presencia de células madre malignas residuales en una muestra patológica que se ha extirpado del cuerpo del paciente y / o para determinar la presencia de células madre cancerosas residuales in situ en un paciente.

10 Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un compuesto para uso en un procedimiento para determinar la presencia de células madre malignas residuales en un paciente en tratamiento para el cáncer, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar a un paciente sometido a dicha terapia para el cáncer, el compuesto fosfolípido fluorescente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; (b) visualizar el tejido que se determinó que era maligno antes de dicha terapia del cáncer; y (c) evaluar la acumulación del compuesto fosfolípido fluorescente en dicho tejido, en el que una acumulación de dicho compuesto fosfolípido fluorescente en dicho tejido indica una posible presencia de células madre malignas residuales.

15 En otra realización más, la invención proporciona un compuesto para uso en un procedimiento para determinar la presencia de células madre malignas residuales en un paciente sometido a terapia para el cáncer, comprendiendo dicho procedimiento (a) la escisión de una muestra patológica de un paciente sometido a dicha terapia para el cáncer; (b) incubar dicha muestra patológica con el compuesto de fosfolípido fluorescente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y (c) la visualización de la distribución de dicho compuesto fosfolípido fluorescente en dicha muestra patológica; en la que una acumulación de dicho compuesto fosfolípido fluorescente en dicha muestra indica una posible presencia de células madre malignas residuales.

20 En otra realización más, los compuestos proporcionados pueden usarse para el control de la respuesta a la terapia tumoral. En una realización preferida, la invención proporciona un compuesto para uso en un procedimiento de control de la respuesta a una terapia tumoral, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar a un paciente antes de dicha terapia tumoral el compuesto fosfolípido fluorescente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; (b) proporcionar dicha terapia tumoral; (c) proporcionar el compuesto fosfolípido fluorescente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 después de la terapia tumoral; y (d) evaluar la diferencia en la acumulación del compuesto fosfolípido fluorescente de la etapa (a) y la etapa (c), en el que una mayor acumulación del compuesto fosfolípido en la etapa (a) en comparación con la menor acumulación en la etapa (c) indica una respuesta positiva a el tratamiento y / o una metodología de tratamiento eficaz.

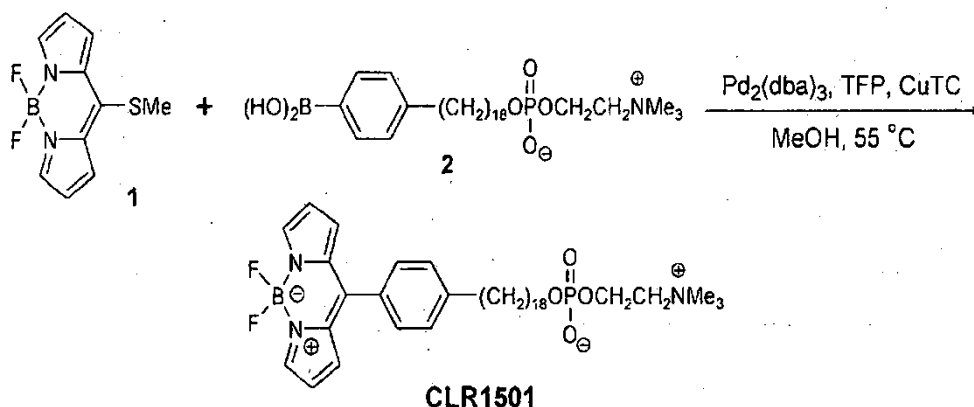
30 La invención se describirá adicionalmente en los ejemplos siguientes. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no deben considerarse para reducir o limitar el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1.

#### Síntesis de 18-*[p*-(4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-il)-fenil]-octadecilfosfocolina (CLR1501).

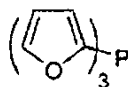
35 La síntesis de CLR1501 se realizó usando la reacción de acoplamiento cruzado de Liebeskind-Srogl (Liebeskind LS, Srogl J. *Org. Lett.*, 2002, 4, 979 – 981) de 18-*[p*-(dihidroxiboril)-fenil]-octadecil fosfocolina **2** con 8-tiometil-BODIPY **1** de acuerdo con el procedimiento publicado (Pena-Cabrera E. et al. *Org. Lett.*, 2007, 9, 3985 – 3988, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 2053 – 2058).



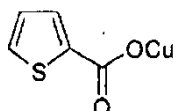
40

$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  = tris-(dibencilidenacetona)dipaladio (0)

TFP = tri-(2-furil)fosfina=



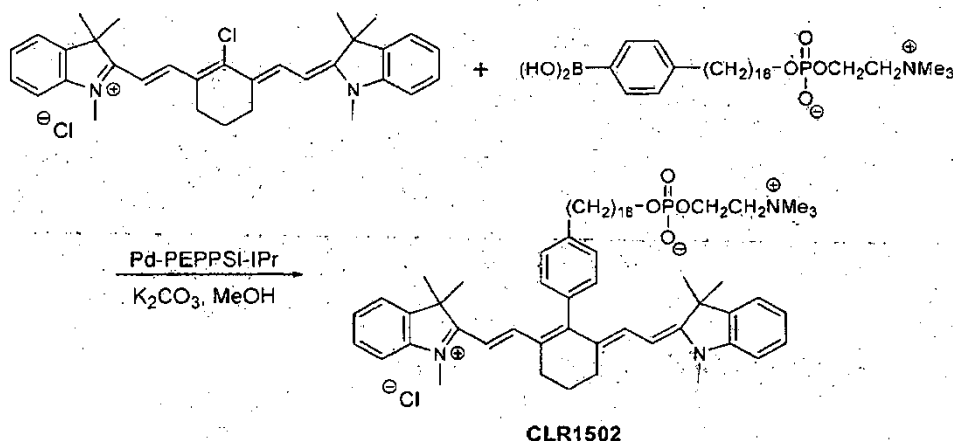
5 CuTC = tiofeno-2-carboxilato de cobre (I) =



10 El 8-(Tiometil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno **1** se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de la literatura (Goud T.V., Tutar A., Biellman J.F. Tetrahedron, 2006, 62, 5084 – 5091).

15 Un matraz de fondo redondo de 20 ml, equipado con una barra de agitación se cargó con 18-[p-(dihidroxiboril)-fenil]-octadecil fosfocolina **2** (194 mg, 0,35 mmol), 8-(tiometil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno **1** (166 mg, 0,7 mmol), CuTC (133 mg, 0,7 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (13 mg, 0,014 mmol) y TFP (16 mg, 0,07 mmol). El matraz se evacuó en alto vacío durante 15 minutos, se rellenó con nitrógeno seco y al matraz se añadió metanol desgasificado (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 1,5 horas, después se enfrió a la temperatura ambiente, se diluyó con 3 - 4 ml de cloroformo y se cargó en la columna de gel de sílice. La columna se eluyó con una mezcla de cloroformo-metanol (9:1, 8:2, 5:5) y finalmente con cloroformo-metanol-agua (65: 25: 4). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se evaporaron y el residuo de color rojo oscuro se secó en alto vacío. Rendimiento de CLR1501: 169 mg (69 %).

20 **Ejemplo 2.**  
**Síntesis del compuesto CLR1502**



25 En el aire, 18-[p- (dihidroxiboril)-fenil] -octadecil fosfocolina (126 mg, 0,23 mmol), cloruro de IR-775 (1,77 mg, 0,34 mmol), carbonato de potasio en polvo (94 mg, 0,68 mmol) y Pd-PEPPSI-IPr (5 mg, 0,007 mmol) se pesaron en un matraz de fondo redondo de 10 ml, y el matraz se mantuvo en alto vacío durante 30 minutos. El matraz se volvió a llenar con nitrógeno y se añadió metanol desgasificado (7 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente y se comprobó por TLC para su conclusión. El ácido borónico de partida aún estaba presente.

30 Se añadió más Pd-PEPPSI-IPr (1 mg) y se continuó la agitación durante 10 horas adicionales hasta la finalización. La mezcla de reacción se cargó en la columna de gel de sílice y se eluyó con mezclas de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:1, 8:2, 5:5), 100 ml de cada y, por último, con CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (65:25:4), 188 ml y CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:65:15), 540 ml. Rendimiento: 140 mg (44 %).

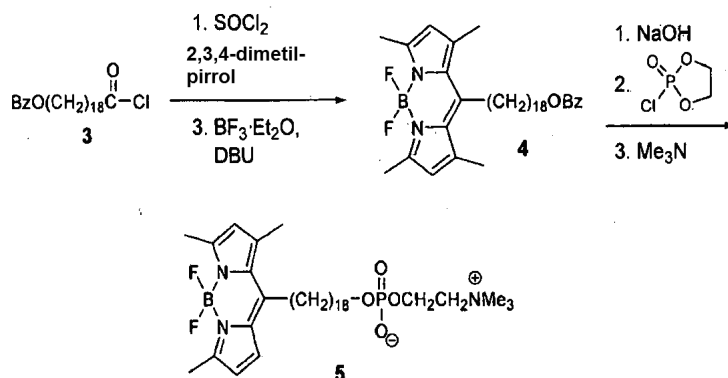
También se puede hacer referencia a CLR1502 como conjugado de IR-775-CLR1501. IR-775 es un colorante comercial fabricado por Sigma-Aldrich®.

Aunque los otros compuestos todavía no se han sintetizado, se contempla que se puedan sintetizar fácilmente con una expectativa razonable de éxito usando procedimientos conocidos y las siguientes enseñanzas de la presente invención:

5

**Ejemplo 3 (síntesis profética)**

**Síntesis de fosfolípidos de alquilo modificados con BODIPY**

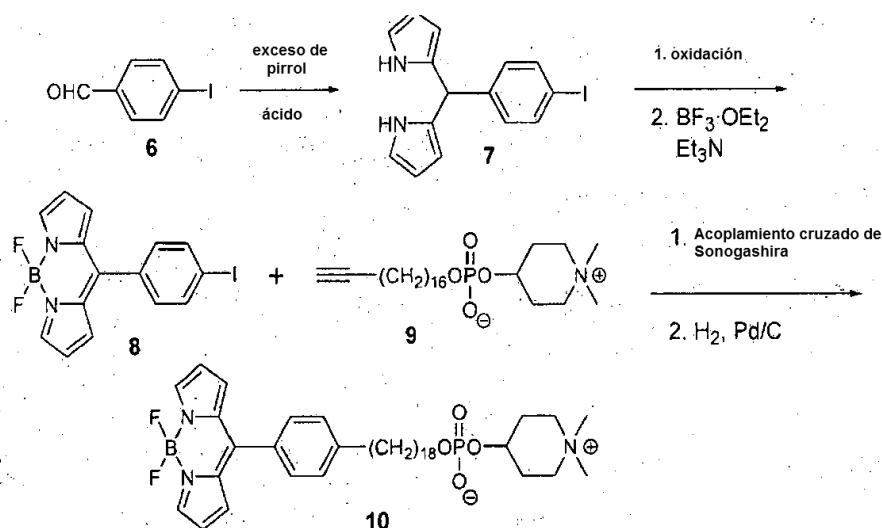


10

**Esquema de referencia 1**

La síntesis de octadecilfosfolina modificada con BODIPY sin un anillo fenilo fragmento entre el fragmento de BODIPY y la cadena de alquilo se muestra en el Esquema 1. La síntesis puede realizarse de acuerdo con la referencia de la literatura (C. Peters et al. J. Org. Chem., 2007, 72, 1842 – 1845). La síntesis se inicia a partir de un cloruro de ácido de cadena larga **3**, que se convierte en el dipirrometeno mediante reacción con 2,5-dimetilpirrol. Este compuesto se utiliza para la introducción del puente BF<sub>2</sub>, proporcionando el intermedio **4** BODIPY que se convierte en la fosfolina **5**.

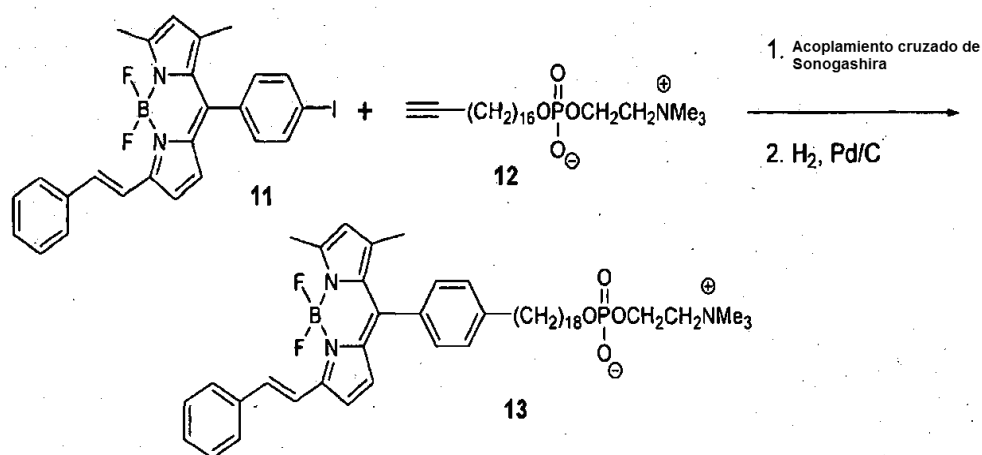
15



**Esquema 2**

20

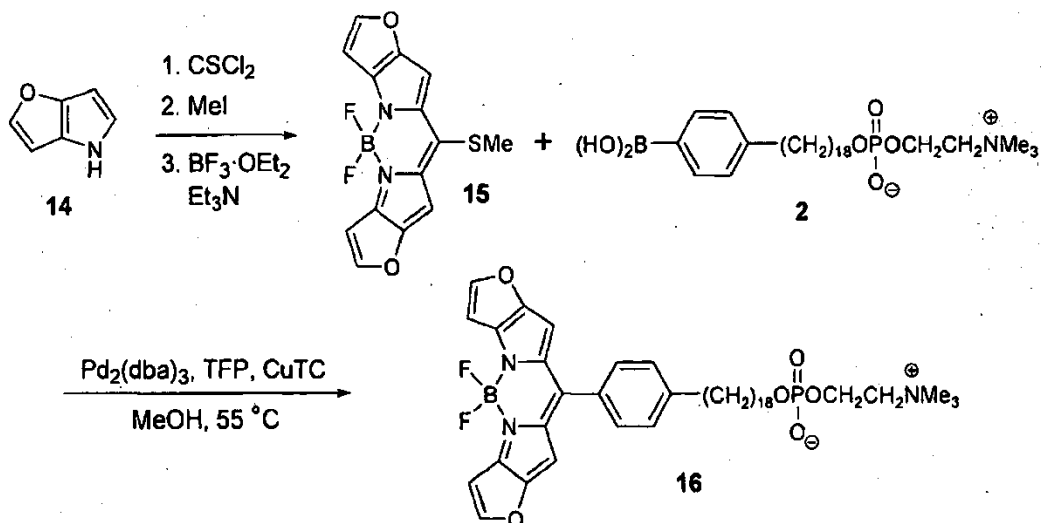
La síntesis del análogo similar a perifosina **10** se muestra en el Esquema 2. La condensación de 4-yodobenzaldehído **6** con pirrol en presencia de una cantidad catalítica de ácido, seguido de la oxidación de **7** y la quelación con BF<sub>3</sub> da 8-(p-yodofenil)-BODIFY intermedio **8** (Loudet A., Burgess K. Chem. Rev., 2007, 107, 4891 – 4932). En la reacción de Sonogashira, este intermedio se somete a reacción cruzada con el fosfolípido acetilénico **9** portador del grupo de cabeza perifosina. La hidrogenación posterior del triple enlace proporciona fosfolípido

fluorescente **10**.

Esquema de referencia 3

5

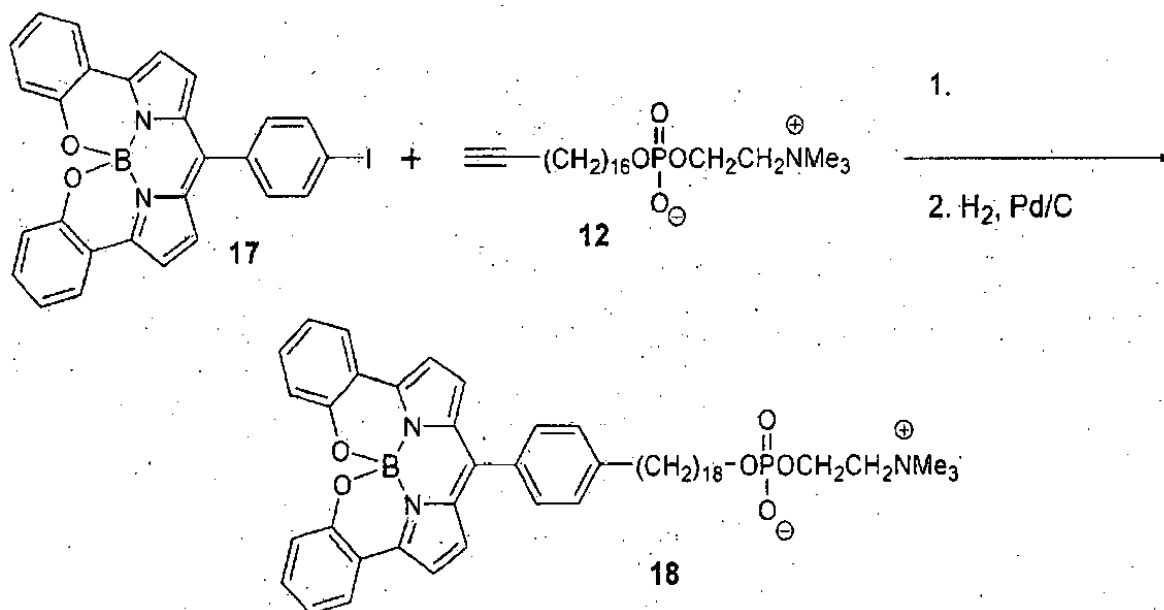
La síntesis de alquilfosfolina fluorescente con BODIPY **13** no sustituido sistémicamente se muestra en el Esquema 3. El núcleo de BODIPY **11** se puede sintetizar de acuerdo con el procedimiento publicado (Li Z., Bittman R. J. Org. Chem., 2007, 72, 8376 – 8382). El resto de la síntesis es similar al que se muestra en el Esquema 2.



Esquema de referencia 4

10

El esquema 4 proporciona un ejemplo de la síntesis de fosfolípidos de alquilo BODIPY fusionados con heteroarilo **16**. Los colorantes BODIPY fusionados con heteroarilo se han descrito en la literatura (Umezawa K, Matsui A, Nakamura Y, Citterio D, Suzuki K. Chem. Eur. J., 2009, 15, 1096 – 1106; Umezawa K, Nakamura H, Makino H, Citterio D, Suzuki K. J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 1550 – 1551), y exhiben coeficientes de extinción altos y rendimientos cuánticos altos en las regiones de rojo lejano e IR cercano del espectro. La síntesis de BODIPY intermedio **15** se basa en los procedimientos proporcionados en la literatura (Umezawa K, Matsui A, Nakamura Y, Citterio D, Suzuki K. Chem. Eur. J., 2009, 15, 1096 – 1106; Goud T.V., Tutar A., Biellman J.F. Tetrahedron, 2006, 62, 5084 – 5091). La síntesis de la alquilfosfolina fluorescente **16** se realiza usando la reacción de acoplamiento cruzado de Liebeskind–Srogl (Liebeskind LS, Srogl J. Org. Lett., 2002, 4, 979 – 981) de 18-[p-(dihidroxiboril)-fenil]-octadecil fosfolina **2** con 8-tiometil-BODIPY **15** de acuerdo con el procedimiento publicado (Pena-Cabrera E. et al. Org. Lett., 2007, 9, 3985 – 3988, J. Org. Chem., 2009, 74, 2053 – 2058).



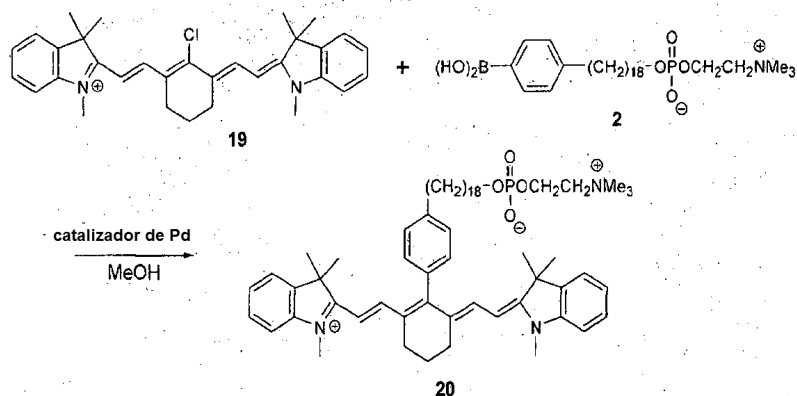
Esquema de referencia 5

- 5 La síntesis del alquifosfolípido fluorescente portador del cromóforo BODIPY restringido se muestra en el Esquema 5. Se demostró que el colorante BODIPY restringido que se incorpora a **18** tenía una emisión de fluorescencia desplazada al rojo, más aguda y más intensa que el colorante original BF<sub>2</sub> (Kim H; Burghart A, Welch MB, Reibenspies J, Burgers K. Chem. Commun, 1999, 1889 – 1890; Loudet A., Burgess K. Chem. Rev., 2007, 107, 4891 – 4932). La síntesis de BODIPY **17** restringido se muestra en la literatura ((Kim H, Burghart A, Welch MB, Reibenspies J, Burgess K. Chem. Commun, 1999, 1889 – 1890). El compuesto BODIPY **17** sufre reacción de acoplamiento cruzado con alquifosfolocolina acetilénica **12** en condiciones de reacción de Sonogashira y el triple enlace se hidrogena para producir el fosfolípido fluorescente **18**.

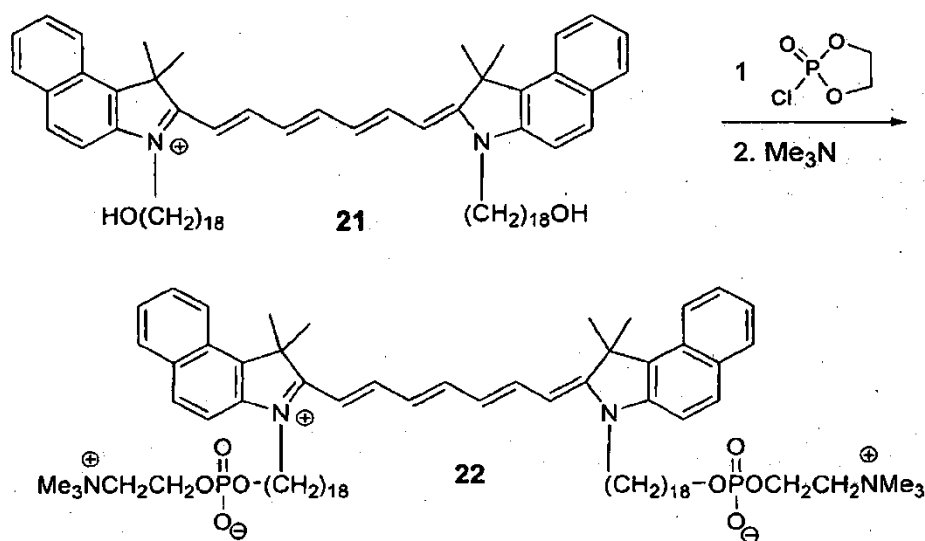
#### Síntesis de alquifosfolípidos modificados con colorante de cianina

- 15 En esta sección se describe la síntesis profética de análogos de éter de fosfolípido conjugados con colorantes de cianina. Las cianinas son fuentes populares de fluoróforos longitud de onda larga con las bandas de excitación en el intervalo de 600 - 900 nm (Goncalves MS. Chem. Rev., 2009, 109, 190 – 212; Ballou B, Ernst LA, Waggoner AS. Curr. Med. Chem., 2005, 12, 795 – 805; Frangioni JV. Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 626 – 634; Mishra A. et al. Chem. Rev., 2000, 100, 1973 – 2011). Ejemplos de análogos de éter de fosfolípidos conjugados con colorantes de cianina incluyen estructuras rígidas (**3**) y no rígidas (**XX**) de polimetina.

20



5 El esquema 6 muestra la síntesis de alquilfosfolípidos fluorescentes a base de cianina rígida **20**. En la literatura se hace referencia a la síntesis del compuesto **19** (Goncalves MS. Chem. Rev., 2009, 109, 190 – 212). El acoplamiento cruzado catalizado con paladio de **19** con 18-*p*-(dihidroxiboril)-fenil]-octadecil fosfocolina **2** proporciona el fosfolípido fluorescente **20**.

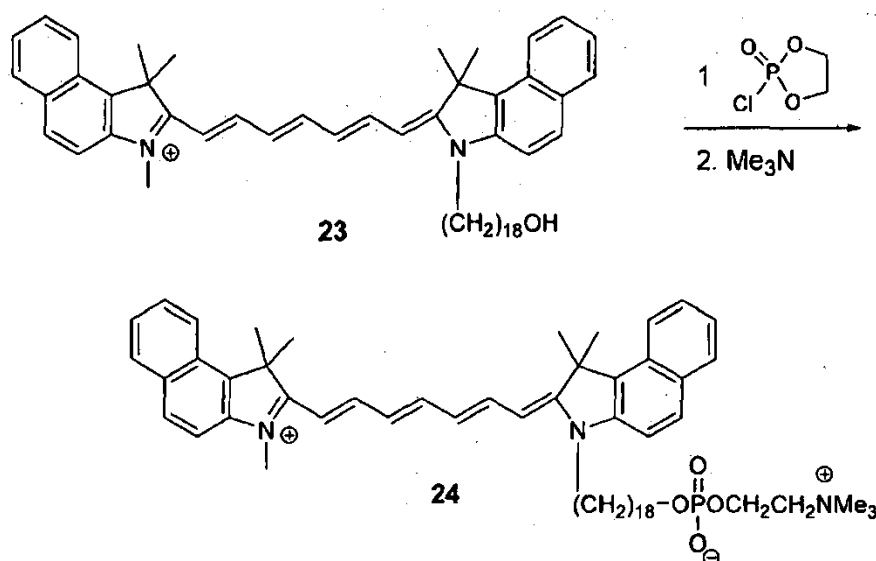


10

15

La síntesis del fosfolípido fluorescente conjugado con colorante de cianina no rígido se muestra en el Esquema 7. El compuesto **21** portador de dos alcoholes de cadena larga se convierte en el análogo de bis-fosfocolina **22**. El **22** compuesto es un derivado bisalquilfosfocolina de verde indocianina (ICG, también conocido como IR-125) que es el único fluorocromo de cianina aprobado por la FDA.





Esquema de referencia 8

Otro ejemplo mostrado en el Esquema 8 incluye el derivado monoalquilfosocolina de verde de indocianina **24**.

## 5 Ejemplo 4

### **Estudios in nitro con CLR1501**

#### Condiciones experimentales

Para estudiar la distribución de CLR1501 en células de piel con cáncer frente a células de piel normal, CLR1501 se introdujo en las células de melanoma de piel (A375) y normales de la piel (704sk), adquiridas de la ATCC. Ambas células se mantuvieron a 37 °C en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 5 % de CO<sub>2</sub>. Antes de la formación de imágenes, las células se retiraron de los matraces con 0,25 % de tripsina y se dejaron crecer durante la noche en los portaobjetos (ibidi, micro-portaobjetos VI planas, n° de Catálogo: 80626). Al día siguiente, se reemplazó el medio con cuidado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las células se incubaron con 7,5 μM de CLR1501 en medio DMEM durante 24 horas. CLR1501 se formuló con 0,4% de polisorbato 20, 2 % de etanol y solución salina. Después de lavar a fondo con PBS, se obtuvieron imágenes de las células utilizando Bio-Rad Radiance 2100 MP Rainbow con un tiempo de exposición de 1 segundo.

#### Resultados

Como las FIG. 1a y 1b demuestran, en las células 704sk, el CLR 1501 parecía transportado a los lisosomas donde fue degradado (FIG 1b). Las células A375 mostraron internalización de CLR1501 en numerosas vesículas fluorescentes que se encuentran dispersas por todo el citoplasma (FIG 1a).

Las FIG. 2a y 2b demuestran perfiles de captación de tiempo precoces de CLR1501 en las células A375 de media hora (Fig. 2a) y una hora (Fig. 2b) después de la incubación. Como demuestra la Fig. 2<sup>a</sup>, después de media hora, las señales son finas y limitada en la membrana plasmática. Hay algunas vesículas endocíticas formadas cerca de la membrana plasmática. Como demuestra la Fig. 2b, en el plazo de una hora, las señales no se concentran exclusivamente en la membrana plasmática: también se observan estructuras intracelulares. También hay una señal más gruesa asociada con la membrana plasmática.

Se realizaron experimentos similares en otras varias líneas celulares cancerosas: adenocarcinoma colorrectal, carcinoma uterino, carcinoma de páncreas, adenocarcinoma de ovarios, glioblastoma, carcinoma de células claras, y el adenocarcinoma de próstata. Por razones de comparación, las células de fibroblastos normales se incubaron con CLR1501.

Brevemente, las células se cultivaron durante la noche en micro portaobjetos VI (ibidi, Verona, WI). Al día siguiente, las células se incubaron con 5 μM de CLR1501 durante 24 horas a 37 °C. Las células se lavaron con PBS antes de que se tomaran las imágenes. Las imágenes se obtuvieron utilizando microscopio confocal Nikon A1R. La duración de la exposición y la intensidad del láser fueron similares entre las muestras. CLR1501 se obtuvo utilizando filtros Alexa Fluor 488 (longitud de onda, 488 nm de excitación - 520 nm).

La Tabla 1 ilustra la intensidad de la señal emitida por CLR1501 en líneas celulares cancerosas en comparación con

las células normales.

**TABLA 1**

	<b>Intensidad gris promedio</b>	<b>Intensidad relativa con respecto a las células normales</b>
<b>NFA (células normales)</b>	14,99	1
<b>Caki-2</b>	151,56	10,11
<b>Ovcar-3</b>	92,86	6,2
<b>Panc-1</b>	143,65	9,58
<b>PC3</b>	180,04	12,01

5 Como la Tabla 1 demuestra, las células tumorales captaron CLR1501 6 12 veces más que las células de fibroblastos normales.

La FIG. 2c muestra los resultados para la línea celular de adenocarcinoma colorrectal (HCT-116);

La FIG. 2d muestra los resultados de la línea celular de sarcoma uterino (MES SA / DX-5);

La FIG. 2e demuestra los resultados de la línea celular de carcinoma de páncreas (Mia Paca-2);

La FIG. 2f demuestra los resultados de la línea celular de carcinoma de páncreas (Panc-1);

10 La FIG. 2g muestra los resultados para la línea celular de adenocarcinoma de ovarios (Ovcar-3);

La FIG. 2h muestra los resultados para la línea celular de adenocarcinoma de ovarios (Ovcar-3);

La FIG. 2i demuestra los resultados de la línea celular de glioblastoma (U-87MG);

La FIG. 2j demuestra los resultados de la línea celular de fibroblastos normales (NFA);

La FIG. 2k demuestra los resultados de la línea celular de carcinoma de células claras (Caki-2); y

15 La FIG. 2l muestra los resultados para la línea celular de adenocarcinoma de próstata (PC3).

Las Figuras 2c-2i y 2k-2l demuestran una captación significativa de CLR1501 en todas estas líneas celulares. Se sabe que el análogo de alquilfosfocolina radioyodado relacionado estructuralmente NM404 (18-p-(yodofenil)-octadecilfosfocolina) sufre una retención prolongada (> 80 días en modelos de ratón) y selectiva en una amplia variedad (37 de 37) de xenoinjerto y modelos de tumor primarios y metastásicos de seres humanos y roedores. Estos experimentos demuestran que CLR1501, un análogo fluorescente de NM404, muestra una captación selectiva y retención similares en líneas celulares tumorales *in vitro*.

25 La FIG. 3 demuestra los resultados de una incubación de células de glioblastoma (U87MG) con CLR1501 durante 48 horas en medio de Eagle MEM a 37 °C con 10% de FBS y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se utilizaron los siguientes colorantes co-teñidos: (Hoechst 33342 (1 µg/ml) (núcleo; color azul), Mitotracker (25nM) (mitocondrias, color rojo) y Blue-White DPX (100 nM) (Retículo endoplásmico (RE), color azul) se diluyeron en PBS y se añadieron a las células durante 15 minutos. Las células se lavaron con PBS y se obtuvieron imágenes con Bio-Rad Resplandor 2100 MP Rainbow.

30 El experimento demostró que CLR1501 se acumulaba principalmente en el citoplasma de las células. El núcleo apareció azul, mientras que las señales rojas mostraron la distribución de las mitocondrias (los colores no se reproducen en las fotografías presentadas con la solicitud PCT). CLR1501 se colocó con las mitocondrias y el RE. Las señales de cian (manchas de forma ovalada oscuras en la FIG. 3) distribuidas sobre todo fuera del núcleo cerca de la membrana nuclear.

35 La FIG. 4 demuestra los resultados del co-cultivo de células NFA y células PC3, incubándolas con CLR1501 y con co-tinción con tinción del núcleo y marcador en mitocondrias. En pocas palabras, las líneas celulares NFA y PC3 se cocultivaron durante la noche en micro portaobjetos VI (ibidi, Verona, WI). Al día siguiente, las células se incubaron con 5 µM de CLR1501 durante 24 horas a 37 °C en medio completo. Al día siguiente, después de lavar con PBS, las células se cotiñeron con tinción del núcleo (Hoechst 33342) y marcador de mitocondrias (Mitotracker), (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se observaron utilizando microscopio confocal Nikon A1R. CLR1501 se excitó y detectó usando filtro Alexa-Fluor 488, mientras que la tinción del núcleo y la tinción de las mitocondrias se excitaron y se detectaron usando el filtro DAPI y el filtro rojo Texas, respectivamente. CLR1501 no se localizó junto con núcleo en ambas líneas celulares normales y tumorales. Sin embargo, CLR1501 se colocó con las mitocondrias en la línea celular PC3, pero no con NFA.

La FIG. 5 demuestra los resultados del cocultivo de células NFA y células Caki-2, incubándolas con CLR1501 y con

co-tinción con tinción del núcleo y marcador en lisosomas. En pocas palabras, las líneas celulares NFA y Caki-2 se cocultivaron durante la noche en micro portaobjetos VI (ibidi, Verona, WI). Al día siguiente, las células se incubaron con 5  $\mu$ M de CLR501 durante 24 horas a 37 °C en medio completo. Al día siguiente, después de lavar con PBS, las células se cotifieron con tinción del núcleo (Hoechst 33342) y marcador de lisosomas (Lyso-tracker), (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se observaron utilizando microscopio confocal Nikon A1R. CLR501 se excitó y detectó usando filtro Alexa-Fluor 466, mientras que la tinción del núcleo y la tinción de los lisosomas se excitaron y se detectaron usando el filtro DAPI y el filtro rojo Texas, respectivamente. CLR501 no se localizó junto con núcleo en ambas líneas celulares normales y tumorales. Sin embargo, CLR501 se colocó con los lisosomas en la línea celular Caki-2, pero mínimamente con NFA.

10 Los experimentos *in vitro* han demostrado también que CLR501 no penetra en el interior del núcleo.

### Ejemplo 5

#### Estudios *in vivo* con CLR 1501 y CLR1502

Los inventores llevaron a cabo estudios *in vivo* de distribución CLR1501 y CLR1502 en ratones desnudos atómicos.

15 A los ratones desnudos atómicos (Hsd: Athymic Nude-Fox1<sup>nu</sup>), inoculados con Panc-1 (carcinoma pancreático), se les inyectó 150  $\mu$ l de 6 mg / ml de CLR1501 formulado en 0,4 % de polisorbato 20, etanol al 2 % y solución salina 24 horas y 96 horas antes de la obtención de imágenes. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando un Kodak In-Vivo Multispectral System FX. El sistema proporciona la sintonización multispectral de luz de excitación que es capaz de separar las señales del colorante y de la autofluorescencia del cuerpo. Se anestesió a los ratones mediante inhalación de isoflurano. Los colorantes se excitaron a 570 nm.

20 La FIG. 6 representa los resultados de este experimento. Las señales verdes muestran la distribución de CLR1501 en tumores (marcado con flechas blancas). La imagen de la izquierda muestra que se inyectó al ratón 24 horas antes de la obtención de la imagen y la imagen de la derecha muestra al ratón al que se inyectó 96 horas antes de la obtención de la imagen. Las flechas negras muestran el área de piel sin piel donde la acumulación de CLR1501 se puede ver en contraste.

25 La señal se encontró sobre todo en los tumores. Sin embargo, las señales también se encontraron en algunos tejidos no cancerosos, en especial, de la piel. No obstante, en el ratón inyectado 96 horas antes de la obtención de la imagen, la acumulación de CLR1501 en el tumor es más pronunciada, mientras que la retención del colorante en otros tejidos se reduce enormemente.

30 A algunos ratones se administraron oralmente 150  $\mu$ l de CLR1501 a 6 mg / ml, se mezclaron con 100  $\mu$ l de emulsión de aceite en fase acuosa (aceite de canola / solución salina) 24 y 96 horas, antes de la obtención de la imagen. La FIG. 7 demuestra las imágenes de los tumores extirpados:

A: Tumor de ratón que ha recibido la inyección IV de CLR1501 24 horas antes de la obtención de la imagen;

B: Tumor de ratón que ha recibido la inyección IV de CLR1501 96 horas antes de la obtención de la imagen;

C: Tumor de ratón que ha recibido la inyección IV de CLR1501 24 horas antes de la obtención de la imagen; y

35 D: Tumor de ratón que ha recibido la inyección IV de CLR1501 96 horas antes de la obtención de la imagen.

La FIG. 8 representa la co-localización en el tumor de CLR1502 en ratón portador del tumor HCT-116. El ratón desnudo atómico (Crl, NU-Foxn1<sup>nu</sup>) se adquirió de Charles River (Charles River, Portage, MI). Al ratón se inocularon  $2 \times 10^6$  células HCT-116 (carcinoma colorrectal humano). Después de 8 semanas, se inyectó al ratón 1 mg de CLR1502 en solución 0,15 ml. CLR1502 se excitó a 780 y se emitió a 800 nm. La intensidad se controló hasta 48 horas utilizando un sistema de imágenes *in vivo* (Li-Cor Bioscience, Lincoln, NE). Al final de 48 horas, se recogieron los órganos del ratón y se obtuvieron imágenes.

Con el tiempo, el CLR1502 acumulado en el sitio del tumor, pero se eliminó del resto de los órganos normales, lo que muestra que CLR1502 es un agente de obtención de imágenes específico del tumor. Se recogieron los siguientes órganos: corazón, tumor, bazo, pulmón; tracto GI (sin lavar); piel; riñones e hígado.

45 La FIG. 9 representa la co-localización en el tumor de CLR1502 en ratón sin piel portador del tumor HCT-1. El ratón desnudo atómico (Crl, NU-Foxn1<sup>nu</sup>) se adquirió de Charles River (Charles River, Portage, MI). Al ratón se inocularon  $1 \times 10^6$  células Panc-1 (carcinoma de páncreas humano). Después de 8 semanas, se inyectó al ratón 1 mg de CLR1501 en 0,15 ml de solución. CLR1501 se excitó a 480 y se emitió a 520 nm. La intensidad se controló a las 24 y 96 horas usando el sistema de obtención de imágenes *in vivo* Kodak (Carestream Health, Woodbridge, CT).

50 Con el tiempo, el CLR1501 se acumuló en el sitio del tumor, mientras que se eliminó del resto de los órganos normales. Las pieles que rodean los tumores se eliminaron los tumores para proporcionar la señal de contraste con CLR1501. En este modelo animal, la piel produce señal de autofluorescencia que se solapa con las longitudes de onda de excitación y emisión de CLR1501.

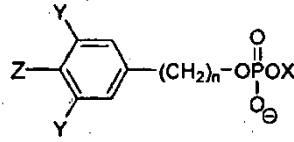
5 La FIG. 10 representa la co-localización en el tumor de CLR1501 en ratones desnudos atímicos. El ratón desnudo atímico (CrI, NU-Foxn1<sup>nu</sup>) se adquirió de Charles River (Charles River, Portage, MI). Al ratón se inoculó con  $1 \times 10^6$  células Panc-1 (carcinoma pancreático humano) que se incubaron con CLR1501 o Kodak X-Sight 761 o ambos CLR1501 y Kodak X-Sight 761 durante 4 horas. Las células se recogieron y se inocularon en diferentes lugares. Las señales procedentes de cada colorante se obtuvieron utilizando el sistema de obtención de imágenes Kodak *in vivo* (Carestream Health, Woodbridge, CT). CLR1501 se excitó a 480 y se emitió a 520 nm, mientras que el Kodak X-Sight se excitó a 750 y se emitió a 830 nm.

Este experimento mostró que CLR1501 se recoge y retiene *in vitro* en células de cáncer y continúa siendo retenido en estas células después de la inyección subcutánea *in vivo*.

10

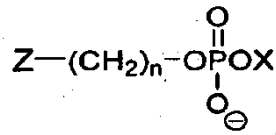
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de éster de fosfolípido fluorescente de acuerdo con la fórmula I:



5

o la fórmula II:

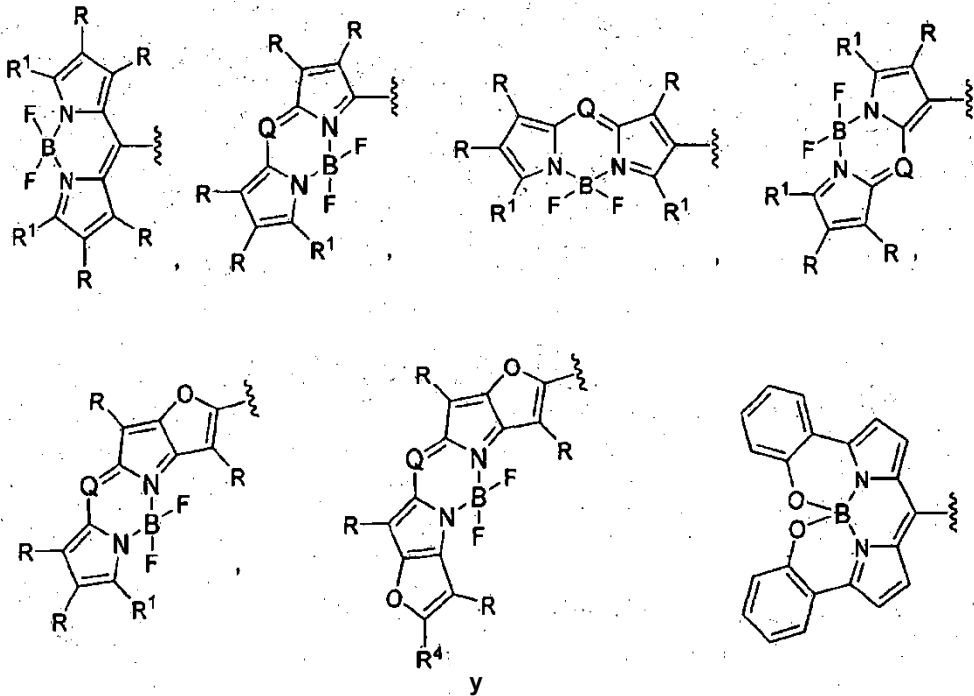


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en la que

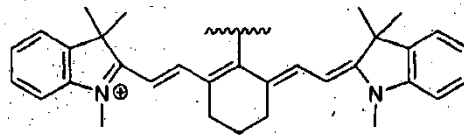
10 n es un número entero entre 7 y 23;

Y es H, Me o Et;

Z es un fluoróforo seleccionado del grupo que consiste en:



15



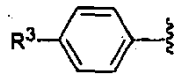
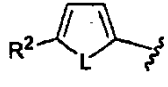
en la que

R se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Br y I.

Q se selecciona del grupo que consiste en N, CH, C-Me, C-Et, C-CF<sub>3</sub>, C-Ph;

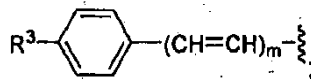
R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en

5



y

10



L se selecciona del grupo que consiste en O, S, NH y NMe;

R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, y Et;

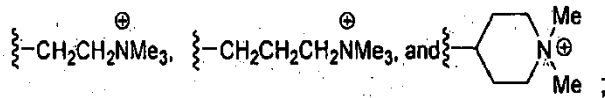
15 R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, OMe, Oet y NMe<sub>2</sub>;

R<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en H, Me, Et, Ph o p-metoxi-fenilo; y

m es un número entero de 1 a 5; y

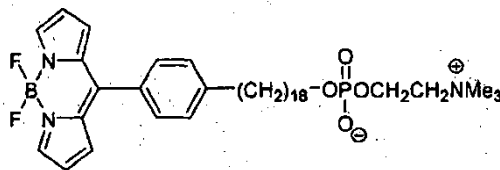
X se selecciona del grupo que consiste en

20



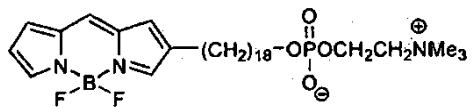
un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de fórmula:

25



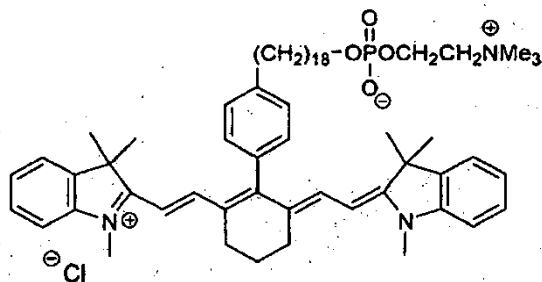
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de fórmula:



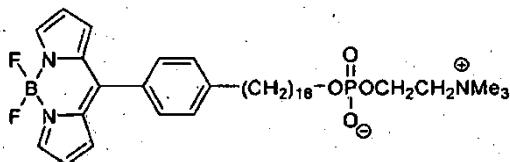
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. El compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula:



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

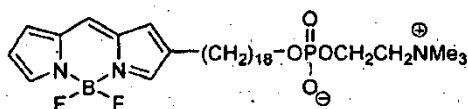
3. El compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula:



15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. El compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es de fórmula:



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Una composición que comprende el compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

- 25 6. Un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento de diagnóstico mediante endoscopia de una neoplasia maligna, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) administrar a un paciente el compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 4;

(b) usar una primera técnica para producir una visualización de la anatomía de la región seleccionada utilizando la primera longitud de onda de un endoscopio;

5 (c) usar una segunda técnica para producir una visualización de la distribución de la fluorescencia producida por el compuesto de éter de fosfolípido fluorescente; y

(d) comparar la visualización de la anatomía de la región seleccionada por la primera longitud de onda con la visualización de la distribución de la fluorescencia por la segunda longitud de onda producida por el compuesto de éter de fosfolípido fluorescente distinguiendo de este modo un tejido benigno del tejido maligno.

10 7. Un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento de selección de un tejido de biopsia en una región que se sospecha que tiene una neoplasia maligna, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) administrar a un paciente un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;

15 (b) usar una primera técnica para producir una visualización de la anatomía de dicha región sospechosa de tener dicha neoplasia maligna utilizando la primera longitud de onda de un endoscopio;

(c) usar una segunda técnica para producir una visualización de la distribución de la fluorescencia producida por el compuesto de éter de fosfolípido fluorescente; y

20 (d) comparar la visualización de la anatomía de dicha región sospechosa de tener dicha neoplasia maligna por la primera longitud de onda con la visualización de la distribución de la fluorescencia por la segunda longitud de onda producida por el compuesto de éter de fosfolípido fluorescente distinguiendo de este modo un tejido benigno del tejido maligno y permitiendo elegir el tejido de biopsia.

25 8. Un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que dicha neoplasia maligna se determina en un órgano corporal seleccionado del grupo que consiste en colon, recto, intestino delgado, esófago, estómago, duodeno, útero, páncreas y el conducto biliar común, bronquios, esófago, boca, senos, pulmón, vejiga urinaria, riñón, cavidad abdominal y cavidad torácica.

30 9. Un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento para diagnosticar una neoplasia maligna de la piel, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar a un paciente el compuesto fosfolípido fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; (b) la visualizar la anatomía de la piel; y (c) distinguir un tejido benigno de un tejido maligno, en el que el tejido maligno muestra significativamente más fluorescencia causada por el compuesto de fosfolípido fluorescente.

35 10. Un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento para determinar márgenes de tejido maligno durante una resección quirúrgica de dicho tejido maligno, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar a un paciente sometido a dicha resección quirúrgica el compuesto fosfolípido fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; (b) visualizar el tejido maligno; (c) determinar los márgenes de dicho tejido maligno, en el que el tejido maligno muestra significativamente más fluorescencia causada por el compuesto de fosfolípido fluorescente, y en el que los márgenes de la región más altamente fluorescente corresponden a los márgenes de dicho tejido maligno.

40 11. Un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento para determinar la presencia de células madre malignas residuales en un paciente sometido, a terapia para el cáncer, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar a un paciente sometido a dicha terapia para el cáncer el compuesto de fosfolípido fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; (b) visualizar el tejido que se determinó que era maligno antes de dicha terapia para el cáncer; y (c) evaluar la acumulación del compuesto de fosfolípido fluorescente en dicho tejido, en el que una acumulación de dicho compuesto fosfolípido fluorescente en dicho tejido indica una posible presencia de células madre malignas residuales.

50 12. Un compuesto de éter fosfolípido fluorescente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento para determinar la presencia de células madre malignas residuales en un paciente sometido a terapia para el cáncer, comprendiendo dicho procedimiento (a) la escisión de una muestra patológica de un paciente sometido a dicha terapia para el cáncer; b) incubar dicha muestra patológica con el compuesto de fosfolípido fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y (c) visualizar la distribución de dicho compuesto fosfolípido fluorescente en dicha muestra patológica; en la que una acumulación de dicho compuesto fosfolípido fluorescente en dicha muestra indica una posible presencia de células madre malignas residuales.

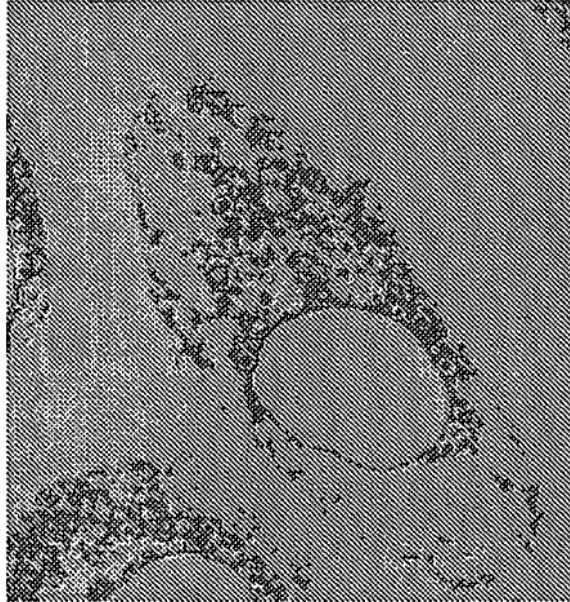
55 13. Un compuesto de éter fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un



- 5 procedimiento de vigilancia de la respuesta a una terapia tumoral, comprendiendo dicho procedimiento (a) administrar a un paciente antes de dicha terapia tumoral el compuesto fosfolípido fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; (b) proporcionar dicha terapia tumoral; (c) proporcionar el compuesto fosfolípido fluorescente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 después de la terapia tumoral; y (d) evaluar la diferencia en la acumulación del compuesto fosfolípido fluorescente de la etapa (a) y la etapa (c), en el que una mayor acumulación del compuesto de fosfolípidos en la etapa (a) en comparación con una menor acumulación en la etapa (c) indica una respuesta positiva al tratamiento y / o una metodología de tratamiento eficaz.
- 10 14. Uso de un compuesto de éter de fosfolípido fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13.

**FIG. 1a**

A375 (melanoma de piel)



**FIG. 1b**

704sk (piel normal)

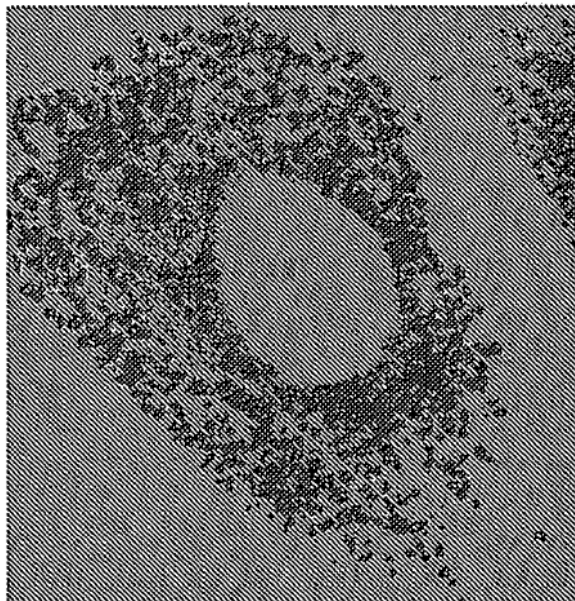


FIG. 2a

A375 (melanoma de piel)

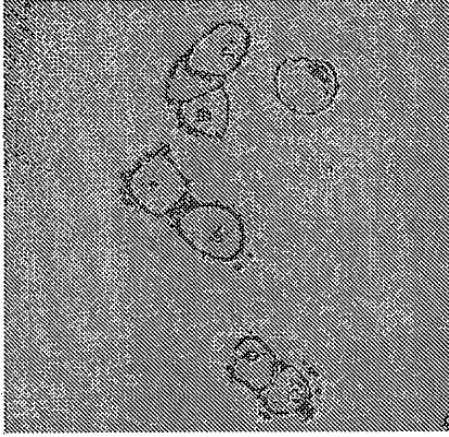


FIG. 2b

A375 (melanoma de piel)



FIG. 2c

HCT-116 (adenocarcinoma colorrectal)

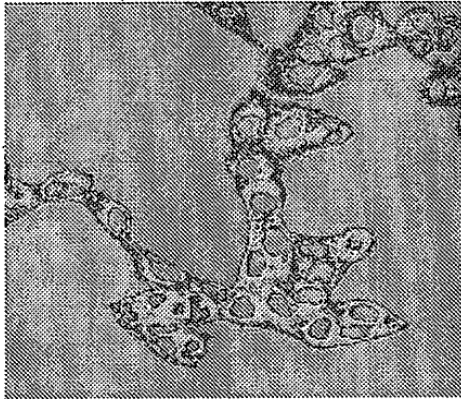
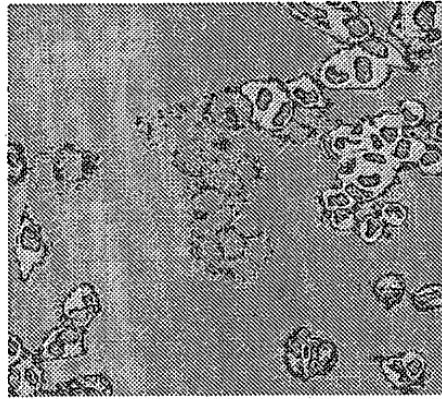


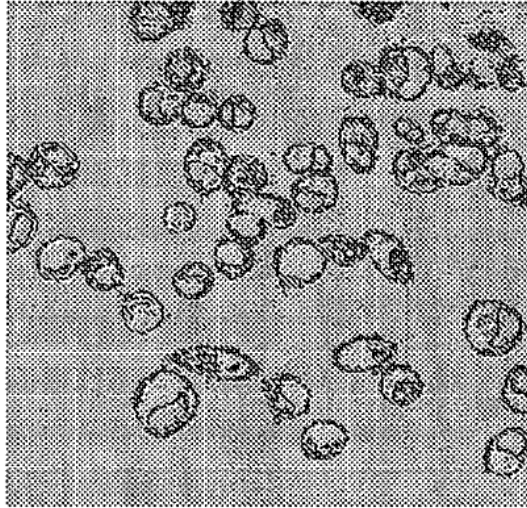
FIG. 2d

MES SA/Dx5 (sarcoma uterino)



**FIG. 2e**

**Mia Paca-2 (carcinoma de páncreas)**



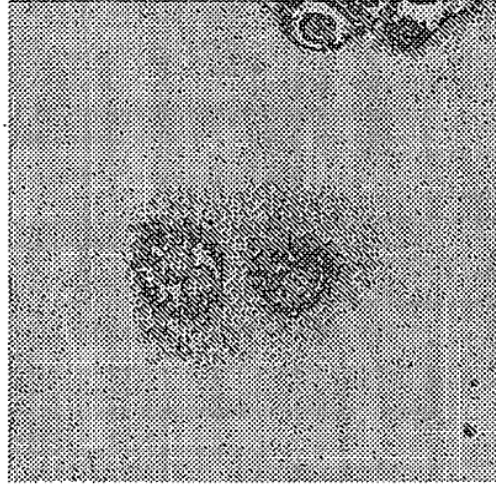
**FIG. 2f**

**Panc-1 (carcinoma de páncreas)**



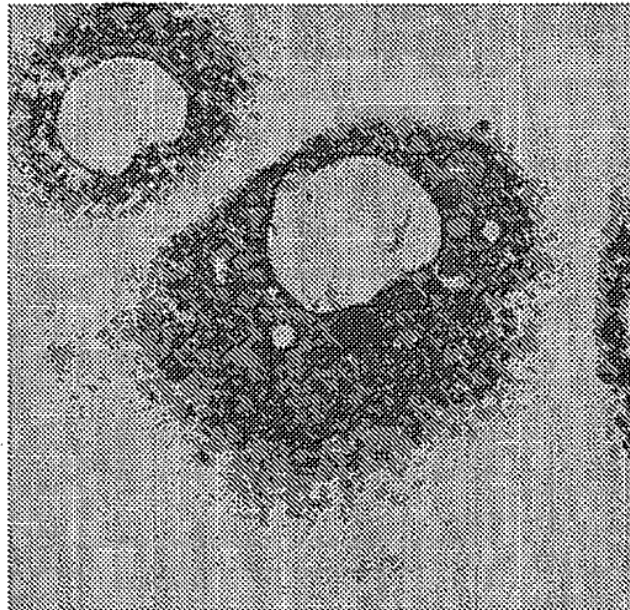
**FIG. 2g**

Ovcar-3 (adenocarcinoma de ovarios)



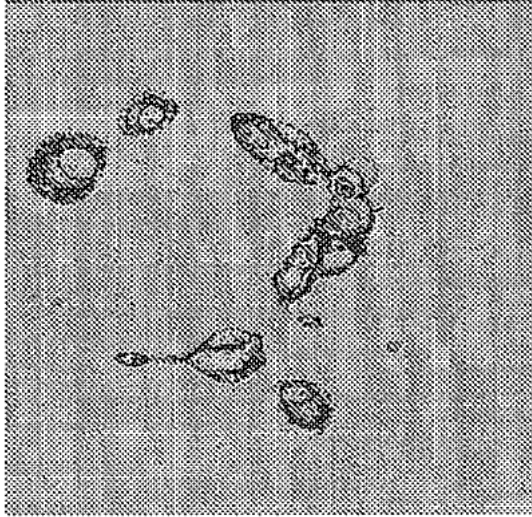
**FIG. 2h**

OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovarios)



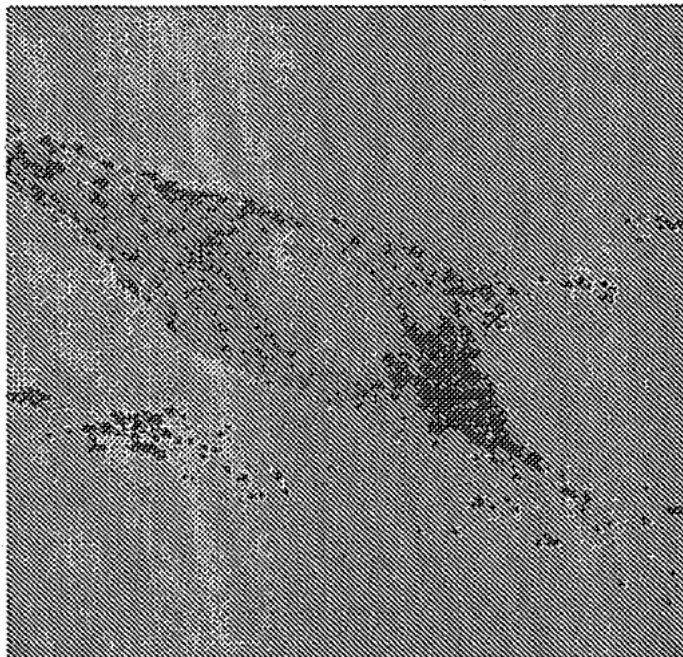
**FIG. 2i**

**U-87MG (Glioblastoma)**



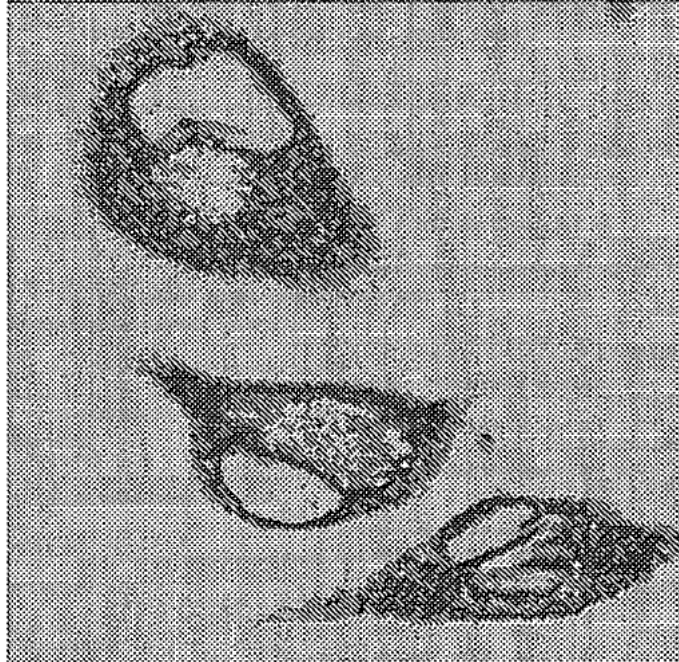
**FIG. 2j**

**NFA (fibroblasto normal)**



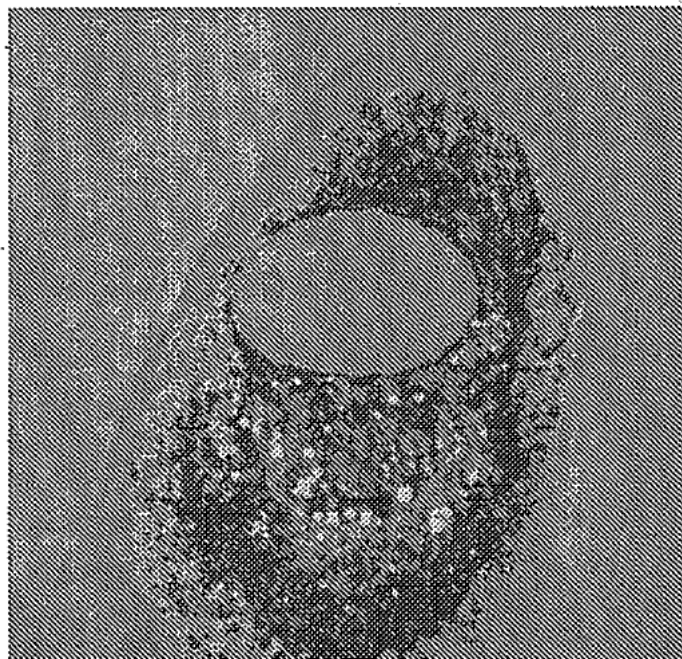
**FIG. 2k**

**Caki-2** (carcinoma de células claras)



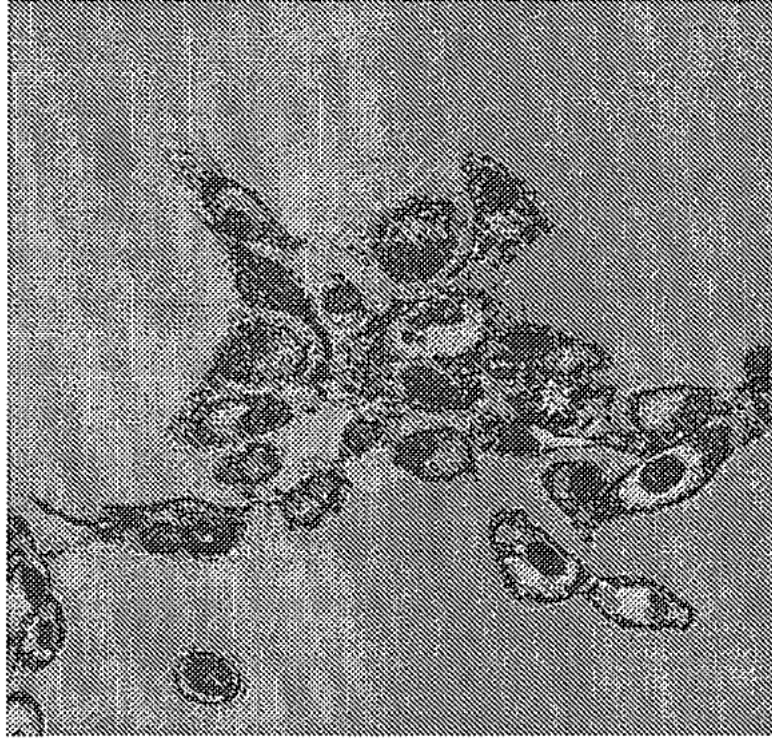
**FIG. 2l**

**PC3** (adenocarcinoma de próstata)



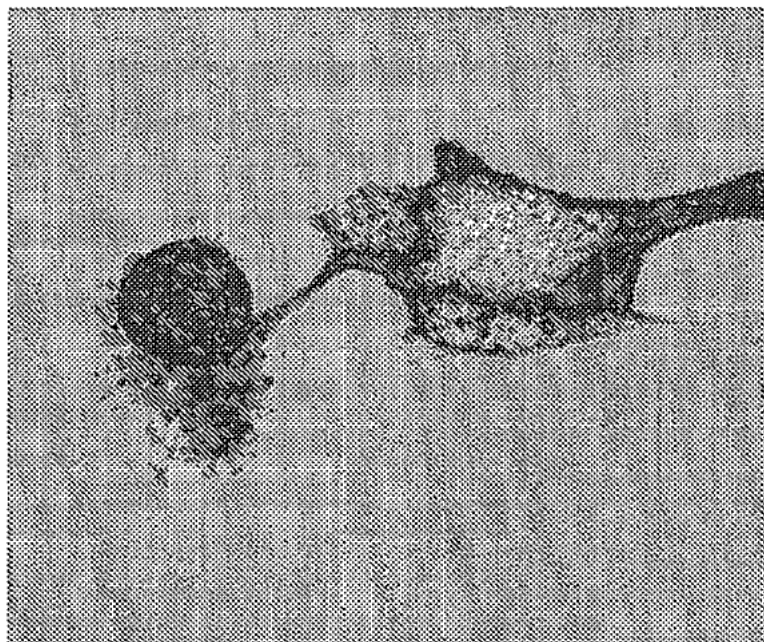
**FIG. 3**

**U-87MG (Glioblastoma)**



**FIG. 4**

**Líneas celulares NFA y PC3**





# FIG. 5

Líneas celulares NFA y Caki-2



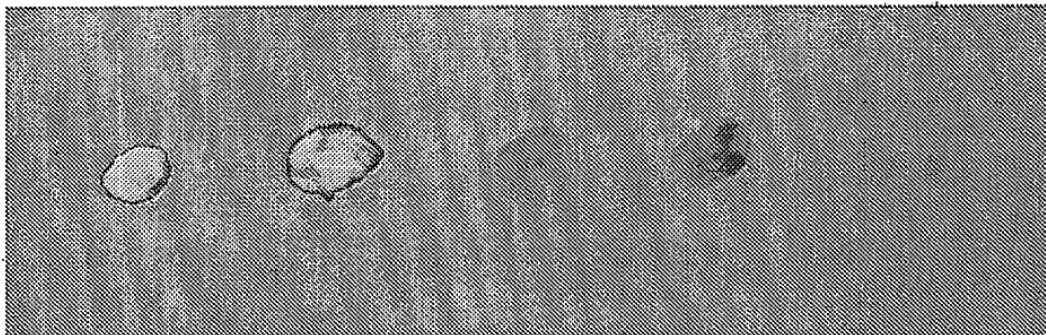
FIG. 6

Ratones atímicos con carcinoma de páncreas



FIG. 7

Tumores escindidos de ratones atímicos con carcinoma de páncreas

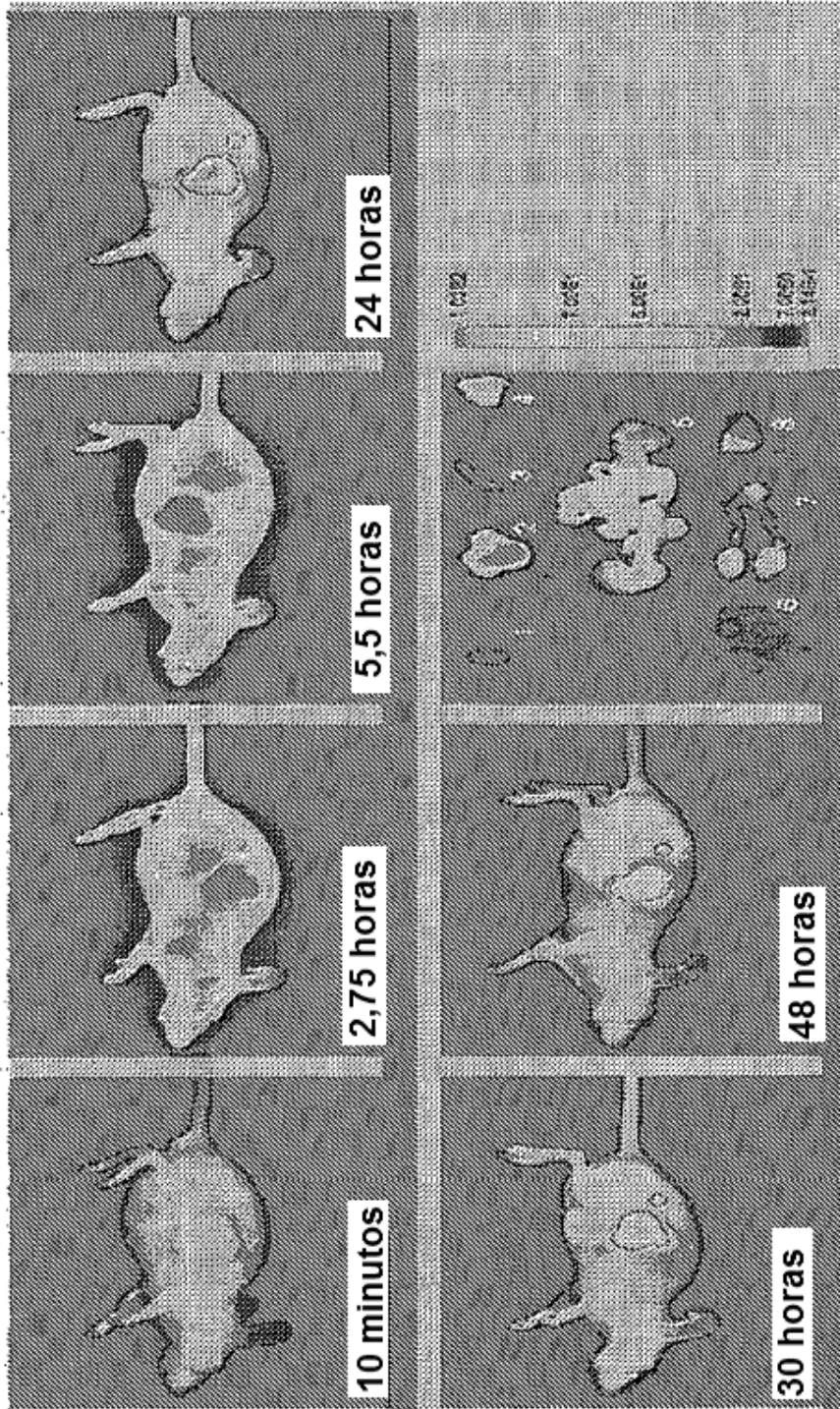


CLR1401 administrado antes de la obtención de imágenes

A	B	C	D
24 h (IV)	96 h (IV)	24 h (Oral)	96 h (Oral)

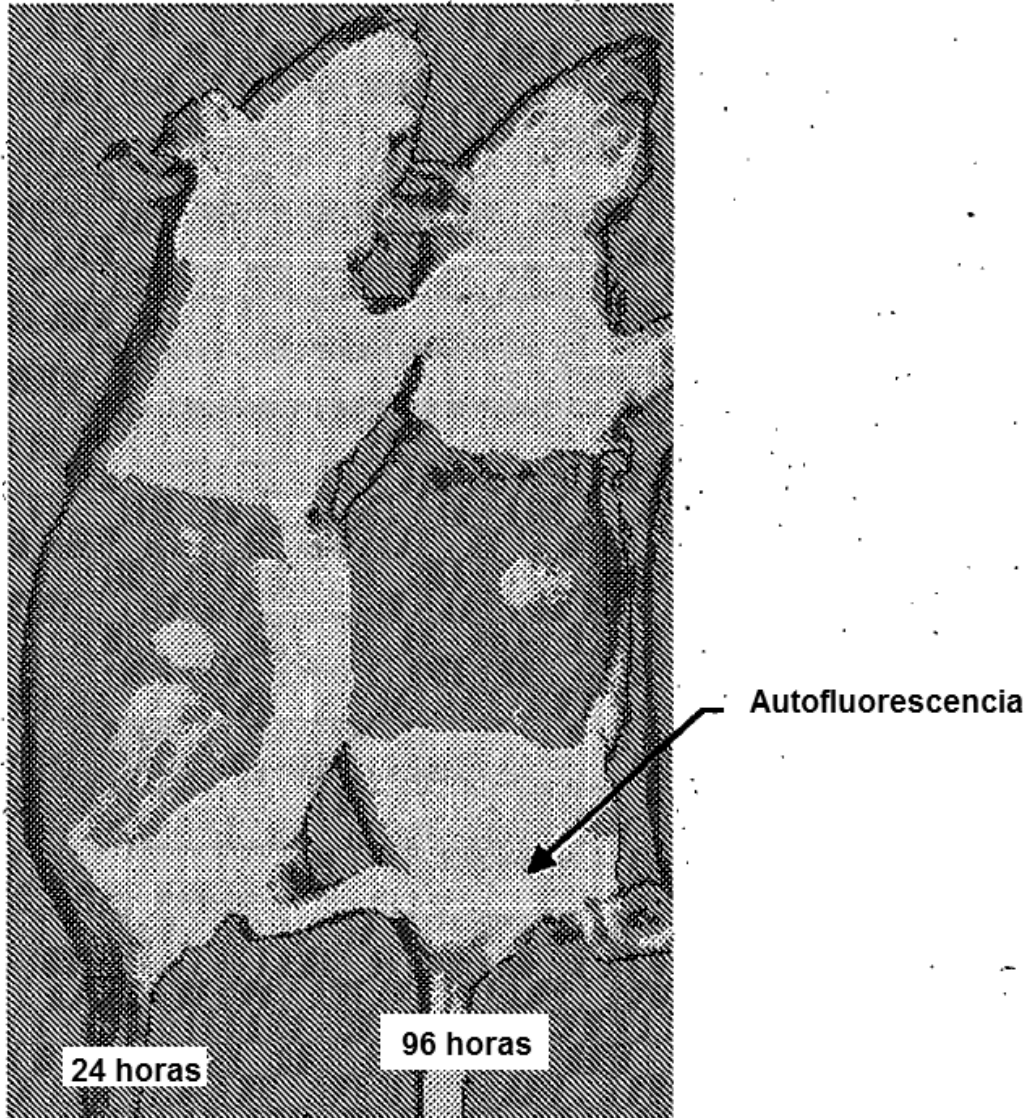
**FIG. 8**

Ratón portador de tumor HCT-116



# FIG. 9

Ratón portador de tumor Panc-1



# FIG. 10

Ratón portador de tumor Panc-1

